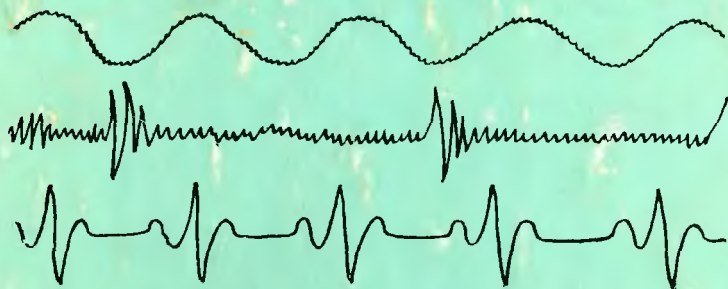
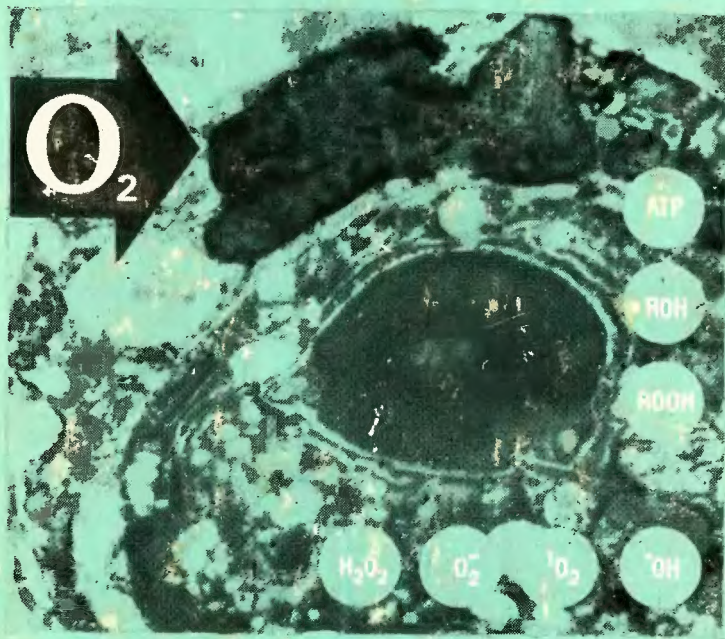


VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

57
484
Л. Д. ЛУКЬЯНОВА, Б. С. БАЛМУХАНОВ, А. Т. УГОЛЕВ

КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКЕ И ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ



Людмила Дмитриевна Лужьянова
Борис Саимович Балмуханов
Абель Танноевич Уголев

**КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ
В КЛЕТКЕ
И ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ**

Утверждено к печати
Отделением физиологии АН СССР

Редактор издательства Н. С. Левитина
Художественный редактор Н. Н. Власик
Технический редактор И. Н. Жмуркина
Корректоры Н. И. Казарина, Г. Н. Лащ

ИБ № 21242

Сдано в набор 08.07.81
Подписано к печати 21.12.81
Т-24083. Формат 84×108¹/₃₂
Бумага типографская № 2
Гарнитура обыкновенная
Печать высокая
Усл. печ. л. 15,96. Усл. кр. отт. 16,06
Уч. изд. л. 17,8. Тираж 1450 экз. Тип. зак. 771
Цена 2 р. 80 к.

Издательство «Наука»
117864, ГСП-7, Москва, В-483, Профсоюзная ул., 90

2-я типография издательства «Наука»
121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10

ВВЕДЕНИЕ

Процессы биологического окисления занимают центральное место в метаболизме клеток. Они служат источником главной массы энергии, необходимой для их жизнедеятельности, готовят строительный материал для создания и обновления клеточных структур, принимают непосредственное участие в самом построении этих структур, включаются в широкий круг реакций, связанных с метаболическими превращениями чужеродных соединений, и пр.

Кислород занимает особое место в этих процессах и является необходимым их компонентом. В живой клетке процессы биологического окисления связаны прежде всего с работой специальных редокс-цепей, по которым происходит перенос водорода и (или) электронов, отщепляемых от органических субстратов. Электронтранспортные кислород-зависимые пути и обеспечивающие их работу ферментные системы и коферменты обнаружены в самых различных мембранах клетки: в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, ядерной мембране, мембранах аппарата Гольджи, в плазматической мембране.

Все многообразие процессов, протекающих с участием кислорода, можно исходя из соответствующих структурных, функциональных и биохимических признаков свести к нескольким основным типам.

1. Оксидазные реакции, катализируемые ферментами, расположенными во внутренней мембране митохондрий. Митохондриальное окисление — это единственный известный пока механизм использования кислорода для образования энергии в клетке.

2. Реакции оксигеназного типа, связанные с электронтранспортной системой эндоплазматического ретикулума и использующие кислород с пластическими целями (система микросомального окисления).

3. Перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот — мощный свободнорадикальный процесс, который может инициироваться, по-видимому, в любых белково-липидных мембранах клетки.

4. Оксидазные реакции различных субклеточных структур, связанные с образованием гидроперекисей и перекиси водорода.

Молекулярно-энзимологическая специфика всех этих процессов интенсивно изучается. Функциональная значимость первых двух типов реакций достаточно хорошо понятна. Они же выступают в качестве главных конкурентов за кислород. Что касается физиологической роли перекисей липидов в нормальной жизнедеятельности клетки, то наши знания об их значимости очень ограничены. Несомненно, что они могут выступать в качестве регуляторов проницаемости клеточных мембран и активности монооксигеназных реакций [2, 52].

Еще меньше известно о функциональной роли в клетке перекиси водорода. Это направление, успешно развиваемое в свое время в работах С. Е. Манойлова [53] и Г. Д. Мировой [55—57] в нашей стране, стало в более поздний период монополией ряда зарубежных лабораторий [108, 114, 160, 506].

Имеющиеся на сегодняшний день данные по этому вопросу заставляют с большой серьезностью относиться к проблеме образования в различных метаболических путях перекиси водорода, сопряженного с активностью клетки, а также организации внутриклеточных механизмов защиты от токсического действия кислорода и интермедиатов его обмена.

Несмотря на то что функциональная значимость этих и других кислородзависимых метаболических путей, связанных с потреблением кислорода, не всегда до конца ясна, несомненно, что благодаря их очень широкому представительству в клетке практически любые внешние воздействия, в том числе и химические агенты, вызывают прямое или опосредованное воздействие на различные звенья окислительного метаболизма и в конечном счете приводят к изменению утилизации O_2 клеткой, тканью, органом и, наконец, организмом. Именно поэтому «тканевое дыхание» издавна используют в биохимических, физиологических и фармакологических исследованиях в качестве показателя интегрального состояния объекта и его реактивности, что позволяет успешно применять его для изучения влияния на клетку различного рода веществ.

Достижения науки за последние 10—20 лет позволили перейти от общей оценки валового потребления O_2 к вычленению отдельных звеньев этого процесса и изучению соот-

ношения работы различных кислородопотребляющих систем [2, 4, 46, 49, 177, 414, 547—550].

Практическая и теоретическая ценность такого рода работ значительно усиливается при условии сохранения в исследованиях физиологического подхода. Дело в том, что представления о механизмах, регулирующих окислительный метаболизм в клетке, касающиеся биоэнергетических аспектов, основаны на данных, полученных главным образом на субклеточном уровне, т. е. в условиях дифференциации живой системы. Учитывая, что любые воздействия, в том числе и химические, при приложении их к изолированным микроструктурам клетки могут иметь иную конечную направленность, нежели в целой клетке, становится очевидной необходимость проведения исследований в более физиологических условиях. Тем не менее систематические сведения о закономерностях интегрирующего влияния сложных биологических систем на направленность окислительно-восстановительных процессов на уровне клетки, органа, и, наконец, целого организма отсутствуют. Следовательно, изучение внутриклеточной регуляции кислородзависимых процессов в функционирующей клетке требует создания адекватных методов исследования. Важнейшими из них являются те, которые позволяют изучать физико-химические процессы, протекающие непосредственно в живой клетке и ее органеллах. Поэтому на первый план выдвигаются быстрорегирующие высокочувствительные, практически безинерционные методы, позволяющие получать кинетические характеристики ответных реакций объекта на внешние воздействия. Успех их применения может быть достигнут лишь в случае комплексного проведения исследований на различном организменном уровне. Так, изучение реакций субклеточных частиц (митохондрий, микросом, пероксисом и пр.) необходимо для понимания молекулярных механизмов регуляции окислительно-восстановительных процессов, для установления закономерностей работы дыхательной цепи и внемитохондриальных путей окисления при тех или иных воздействиях.

В отличие от этого экспериментирование на клеточных системах позволяет установить специфику механизмов, регулирующих и контролирующих окислительные процессы в интактной клетке, при условии сохранения интегрированности ее структуры, но отключения от регулярных механизмов целого организма. В этом случае возможно также исследование сопряжения метаболических путей в клет-

ке. Подобного рода объекты, как известно, широко используются в качестве модели в биохимических и физиологических исследованиях. Наконец, изучение окислительного метаболизма органов в условиях *in situ* дает возможность получить данные о специфичности интересующих воздействий при условии сохранения регуляторных связей тканей и органов, тканевых систем с организмом, т. е. в прижизненных и хронических опытах. При этом имеется максимальная возможность выяснить влияние кооперативной деятельности сложных систем на протекание метаболических процессов в норме и патологии.

Можно с удовлетворением констатировать, что круг экспериментаторов, занимающихся всеми этими вопросами на уровне интегрированных систем, с каждым годом расширяется. Исследования такого плана очень многим обязаны Бриттону Чансу и его ученикам, которым удалось блестяще показать, что различные аспекты организации клеточной деятельности и физиологии клетки описываются параметрами биохимических и биоэнергетических реакций и регулируются ими.

Для проведения подобного рода исследований в настоящее время имеются несколько методов определения различных показателей окислительного метаболизма тканей.

Один из методов, получивших чрезвычайно широкое распространение в биологии, основан на полярографическом измерении концентраций кислорода в тканях и жидкостях, дающем возможность судить о снабжении органов и тканей кислородом либо о скорости его потребления. Полярографическое определение скоростей потребления кислорода в различных стационарных состояниях, позволяющее оценить состояние дыхательной цепи, а также пунктов, в которых произошли нарушения, проводится как на классическом для биохимиков объекте — изолированных митохондриях, так и на сложноорганизованных системах — клетке, тканях.

Исследование соотношения окисленных и восстановленных форм компонентов дыхательной цепи является еще одним из аспектов, позволяющих судить об интенсивности функционирования этих механизмов. Изучение этого процесса стало возможным благодаря применению оптических методов и базируется на наличии характерных спектров поглощения и люминесценции в ультрафиолетовой и видимой части спектра у восстановленных и окисленных форм ферментов и коферментов, входящих в эти системы.

Возможность использования этих методов не только на уровне клеточных органелл, но и применительно к целым клеткам, тканям и даже органам, а также получения с их помощью быстрых кинетических характеристик процесса делает эти методы неопенимыми в прижизненных наблюдениях, ставящих целью наблюдение и регистрацию ответных реакций с той подвижностью, которая присуща им в организме, а также изучение окислительно-восстановительных превращений в неповрежденной ткани.

Метод спектрофлуорометрического изучения редокс-состояния переносчиков электронов в дыхательной цепи получил в последнее время самое широкое распространение [26, 158, 159, 342, 543—548]. Он характеризуется высокой чувствительностью, информативностью, дает возможность исследования динамических процессов. Наиболее результативно использование этого метода в сочетании с полярографической регистрацией дыхания.

Представленный круг вопросов отражает методические возможности современной биофизики, которые могут расширить изучение проблемы регуляции окислительного метаболизма в организме. В их основе лежат высокочувствительные, быстрорегирующие методы, позволяющие исследование кинетики процесса при сохранении интактности гетерогенной структуры и параллельное сопоставление с самыми различными физиологическими показателями.

В связи со всем этим основной своей задачей авторы считали систематизацию накопленного экспериментального материала (литературного и собственного) о роли кислородзависимых процессов в формировании специфической функции клетки. Что нового вносит структурная организация клетки в ее окислительный метаболизм, каким образом осуществляются регуляция и контроль окислительно-восстановительных кислородзависимых реакций в ней, конкурентны или синергичны эти процессы и какова значимость существующего между ними взаимодействия для поддержания физиологического статуса клетки — вот вопросы, которым уделено главное внимание. В центре рассмотрения находятся проблемы энергетической регуляции и контроля дыхания в интактной клетке, возможности прижизненного исследования этого процесса, а также его взаимодействия с другими метаболическими путями через участие в регулировании внутриклеточного редокс-потенциала.

В монографии нет специального раздела о роли перекисного окисления липидов. Роль последних в процессах регуляции обмена обсуждалась неоднократно в специальных изданиях по этому вопросу. Однако авторы сочли необходимым подробно остановиться на значимости в жизнедеятельности клетки промежуточных продуктов восстановления кислорода, в том числе перекиси водорода, считая данное направление чрезвычайно перспективным в плане рассматриваемых вопросов.

В монографии впервые также поднимается вопрос о связи внутриклеточных редокс-систем с продуцированием клетками восстановительных эквивалентов во внешнюю среду, т. е. с потенциалобразующей их активностью.

Наряду с перечисленными вопросами авторам казалось важным, используя литературные и собственные данные, еще раз остановиться на не новой уже проблеме транспорта кислорода в клетку с тем, чтобы в свете последних данных подчеркнуть не столько диффузионный, сколько функциональный характер этого процесса, опосредованный активностью кислородзависимых метаболических путей. Вопрос о «внутриклеточной рецепции» кислорода интенсивно изучается и обсуждается в настоящее время.

Нам представлялось также важным остановиться на некоторых вопросах практического применения наших сведений о кислородзависимых путях в клетке с целью их использования для поиска новых химических соединений, специфически взаимодействующих с различными звеньями окислительного метаболизма, что представляет несомненный интерес для фармакологии и медицины.

Мы не ставим своей задачей подробное изложение молекулярных основ работы различных редокс-цепей, считая, что эти вопросы должны рассматриваться в специальной литературе. Мы не стремились также к тому, чтобы дать исчерпывающую библиографическую сводку работ, имеющих в настоящее время по интересующей проблеме. Нам представлялось более важным дать ей общую характеристику и показать чрезвычайно высокую организацию внутриклеточного метаболического контроля, свидетельствующего, что уже на уровне клетки существуют механизмы адаптации к внешним воздействиям, защиты и компенсации, позволяющие вести поиск регуляторов, среди которых кислородзависимые процессы занимают одно из ведущих мест.

Наконец, нам представлялось необходимым наглядно продемонстрировать преимущества и методическую доступность прижизненного проведения комплексной регистрации физиологических и метаболических параметров, которые обеспечивают самую высокую информативность и возможность интерпретации наблюдаемых явлений в терминах молекулярной биологии. Таким образом, появляется предсказанная еще И. П. Павловым возможность анализа и понимания внутриклеточной сущности сложных физиологических явлений.

В монографии изложен экспериментальный материал, полученный сотрудниками отдела функциональной биохимии Научно-исследовательского института по биологическим испытаниям химических соединений Минмедпрома О. А. Поповой, В. Е. Романовой, Г. Н. Костяевой, С. В. Замулой, Л. В. Мерцаловой, С. В. Харадуровым, которым авторы приносят свою большую и искреннюю признательность за помощь в работе.

Авторы хотели бы также выразить благодарность сотруднику отдела Н. М. Ваславской, принимавшей участие в оформлении рукописи.

1. КИСЛОРОД И КЛЕТКА

ТРАНСПОРТ КИСЛОРОДА К ТКАНЯМ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

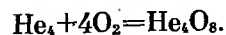
Можно условно выделить три основных круга вопросов, относящихся к проблеме кислородного обеспечения тканей в организме. Первый из них связан с регулированием кислородного гомеостаза в организме и его транспортом к клеткам; второй — с переносом кислорода из внеклеточного пространства через клеточную мембрану; третий касается использования кислорода в различных метаболических путях в самой клетке.

Парциальное давление кислорода в атмосфере равно 159 мм рт. ст., а минимальное парциальное давление кислорода в клетке, определяющее граничные условия ее функционирования, лежит в пределах 1—10 мм рт. ст. [601]. Наличие такого большого градиента объясняет создание самых различных систем транспорта кислорода из окружающей среды в клетку. Это решается неоднородно у организмов различного эволюционного уровня.

В наиболее простом случае — у одноклеточных — транспорт кислорода происходит в результате диффузии, благодаря наличию градиента напряжения кислорода (pO_2) между клеткой и внеклеточной средой. Регуляция этого процесса осуществляется, видимо, за счет активности кислородзависимых ферментных систем клетки, расположенных в различных ее компартментах. До сих пор остается неясной роль клеточной оболочки в этом процессе, но вполне вероятно, что она может принимать участие в регуляции транспорта кислорода. Тем не менее корректные доказательства, на основании которых можно было бы сделать окончательные выводы по этому вопросу, отсутствуют. У бактерий, как известно, ферменты дыхательной цепи находятся в плазматической мембране, что обеспечивает их максимальное приближение к внешним источникам кислорода и облегчает проблему его доставки к ним. У простейших многоклеточных типа кишечнополостных

аэрация полости тела, находящейся в худших условиях кислородного снабжения, осуществляется либо за счет появления системы каналов, увеличивающих возможности пассивной диффузии, либо, как у гидры, с помощью принудительной смены жидкости благодаря движению ресничек, т. е. уже с затратами энергии. У многих насекомых кислород транспортируется из внешней среды к клеточной мембране благодаря трахейной системе. Известны организмы, обладающие сильно развитым кожным дыханием, с помощью которого к клеткам поступает значительная (у амфибий, например, до 60%) доля потребляемого кислорода. Животные, имеющие систему кровообращения, обладают особой многоступенчатой системой транспорта кислорода практически ко всем клеткам организма. У позвоночных и человека этот процесс четко разделяется на три этапа: внешнее дыхание, транспорт газов кровью и тканевое дыхание. В целом все эти этапы находятся под контролем и регулируются воздействиями центральной нервной системы и нейрогуморальных механизмов. Каждое звено обладает своими компенсаторными возможностями и особенностями, обеспечивающими поддержание и сохранение кислородного гомеостаза в широких пределах изменений внешних условий. В виде схемы работу всей кислородтранспортной системы можно представить следующим образом.

Кислород, поступающий вместе с воздухом (или водой) в орган дыхания (легкие, жабры и т. д.) через ткань, выстилающую внутреннюю поверхность органа, диффундирует в носитель (у подавляющего большинства животных это кровь), далее системой органов кровообращения разносится по организму, поступает в межклеточную жидкость и затем в клетки. В силу очень низкого коэффициента растворимости лишь очень небольшая часть молекулярного кислорода находится в крови в растворенном виде, тогда как основная его масса, обратимо связываясь с особым белком гемоглобином, имеющим четыре центра связывания с O_2 , депонируется в клетках крови — эритроцитах:



(1)

Образование и диссоциация комплекса кислорода с гемоглобином играют большую роль в кислородном обеспечении тканей и одновременно являются наиболее изученным регуляторным механизмом дыхания.

Таким образом, транспорт кислорода из внешней среды

к отдельным клеткам и тканям является многоступенчатым процессом и включает в себя как активный, так и пассивный механизм. Активным является поступление кислорода вместе с воздухом в дыхательные пути. Оно обеспечивается сокращением дыхательных мышц, сжатием и распирением легких. Активным (в смысле принудительным) является транспорт кислорода кровью, его связывание с гемоглобином, а также движение в межклеточной жидкости и пр. В отличие от этого, обмен газов между кровью капилляров и тканями носит преимущественно пассивный характер. В его основе лежит диффузия. Со времени исследований Круга [39] считается, что она является важнейшим механизмом транспорта газов в тканях. Физическая природа процесса заключается в том, что количество диффундирующего вещества за определенное время прямо пропорционально градиенту концентраций. Поэтому градиент концентраций кислорода является основным параметром, определяющим транспорт кислорода из крови в ткань. Чем он выше, тем при прочих равных условиях интенсивнее поступление кислорода в ткани. Важное значение для оценки диффузии как механизма транспорта кислорода в живых тканях имеет коэффициент диффузии — D . Он численно равен массе вещества, перенесенного за единицу времени через единицу поверхности при градиенте концентраций, равном 1. В биологии часто применяют диффузионную константу Круга (D_K) [346], равную произведению коэффициента диффузии на растворимость кислорода в среде (α):

$$D_K = D\alpha. \quad (2)$$

Таким образом, константа Круга характеризует скорость переноса при фиксированном напряжении кислорода в среде и может быть измерена экспериментально. Если, помимо свободной диффузии, в биологической системе осуществляется транспорт этого вещества в том же направлении с помощью особой системы переноса, то говорят об облегченной диффузии. В отличие от простой диффузии, для которой ее скорость прямо пропорциональна градиенту концентрации, для облегченной диффузии характерным признаком является насыщение системы переноса при высокой концентрации вещества внутри диффузионного пространства, когда дальнейшее увеличение концентрации не приводит к изменению скорости диффузии. Облегченная диффузия протекает всегда в направлении уменьше-

ния электрохимического градиента и не нуждается в энергии.

На пути, который кислород преодолевает до того, как попадает в клетку, имеется несколько участков, где диффузионные процессы играют основную роль. Это происходит там, где молекулы кислорода проникают через мембранные образования: альвеолярную мембрану, мембрану капилляров, оболочку эритроцита, клеточную мембрану. Конечной целью этого пути является обеспечение клеток кислородом, без которого невозможны процессы биологического окисления, сопряженные со специфической функцией тканей и органов. Поэтому нарушение нормального режима функционирования практически на любом участке пути, по которому транспортируется кислород, может привести к недостаточному обеспечению им ткани и в конечном итоге к потере функции клетки.

В условиях нормальной жизнедеятельности организма интенсивность внешнего дыхания и возможности транспортной функции крови должны быть строго сбалансированы с суммарной скоростью потребления кислорода в тканях. Механизмы, регулирующие первые два этапа кислородного гомеостаза, несомненно должны быть связаны с гомеостатической регуляцией потребления кислорода в отдельных клетках. В связи с этим особую значимость приобретает изучение транспорта кислорода на его последнем участке пути к клетке — при его переходе из капилляров в ткань и проникновении в глубь ткани и в клетки.

Согласно современным представлениям молекулярный кислород, освобождающийся при диссоциации гемоглобина в капиллярах, благодаря диффузии проходит через капиллярную стенку, межклеточную среду и поступает в клетки тканей, чему способствуют малый размер и электрическая нейтральность его молекулы. Скорость диффузии кислорода в клетку и ткань определяется разностью его концентраций между внутри- и внеклеточной средой. Концентрация O_2 во внеклеточном пространстве зависит от уровня оксигенации крови и удаленности клетки от капилляра. Внутриклеточная концентрация определяется соотношением между скоростью поступления кислорода в клетку и скоростью его утилизации. Увеличение скорости поглощения O_2 в клетке приводит к уменьшению его внутриклеточной концентрации и парциального давления, что влечет за собой увеличение градиента pO_2 через клеточную мембрану и скорости диффузии. Таким

образом, увеличение активности кислородпотребляющих метаболических путей клетки должно стимулировать поступление в нее кислорода. Уменьшение внеклеточной концентраций кислорода ведет к снижению внутриклеточного pO_2 , поэтому после достижения определенного нижнего порога оно может тормозить работу окислительных систем клетки.

На протяжении многих десятилетий обсуждается вопрос: является ли диффузия кислорода единственным механизмом переноса этого газа через гистогематические барьеры и клеточную мембрану? Спорность проблемы объясняется исключительной сложностью экспериментальной проверки решаемых задач. Обеспеченность тканей кислородом непосредственно зависит, во-первых, от анатомо-морфологических и физиологических особенностей капиллярной сети данной ткани (капилляризации ткани, расстояния капилляров от клетки, их диаметра, протяженности, скорости кровотока в них, морфофизиологических особенностей строения капиллярной стенки, функционального состояния капилляров в различное время) и, во-вторых, от анатомо-морфологических и физиологических особенностей самой ткани (размеров и количества клеток, приходящихся на единицу площади, особенностей межклеточных контактов, величины и топографии межклеточных каналов, характера движения межклеточной жидкости в них, химического и ферментного состава клеток, их функционального состояния). К этому следует добавить, что вся эта сложная система гистогематических барьеров в условиях целого организма находится под нейрогуморальным контролем. Насколько может варьировать диффузия кислорода в разных тканях, можно видеть из табл. 1.

Таблица 1. Константа диффузии для различных тканей

Ткань	$K, \text{см}^2/\text{мин} \cdot \text{атм}^{-1}$	Ис-точ-ник	Ткань	$K, \text{см}^2/\text{мин} \cdot \text{атм}^{-1}$	Ис-точ-ник
Вода	$3,4 \cdot 10^{-5}$	[346]	Стенка мочево-го пузыря	$2,2 \cdot 10^{-5}$	[564]
Хитин	$1,3 \cdot 10^{-7}$		Печень свиньи	$1 \cdot 10^{-5}$	[257]
Мышца	$1,9 \cdot 10^{-5}$		Роговица глаза	$0,6 \cdot 10^{-5}$	[531]
Нервная ткань	$2,3 \cdot 10^{-5}$	[172]			

Поэтому вопрос о транспорте кислорода на участке капилляр—клетка решается главным образом путем моделирования, что неизбежно предусматривает ряд серьез-

ных ограничений и упрощений сравнительно с реальной существующей ситуацией в живом организме.

Вопрос о механизме транспорта кислорода на участке капилляр—клетка многократно обсуждался в работах советских исследователей [10, 24, 30, 31]. Резюмируя имеющуюся на сегодняшний день полемику и учитывая экспериментальный материал, существующий по этому вопросу, необходимо отметить следующее.

Видимо, следует признать, что убедительных доводов для предположения о возможности активного транспорта кислорода через биологические мембраны на сегодняшний день нет. Кислород — это инертный газ, его молекула электронейтральна, и нет никаких доказательств или хотя бы намеков, что его перенос через гистогематические барьеры или плазматическую мембрану происходит с затратами энергии; энергетические расходы на транспорт кислорода определяются только работой мускулатуры и передвижением крови по сосудам. Таким образом, спор в целом решается в пользу диффузии. Благоприятные для нее условия в организме животных создаются за счет концентрационных градиентов pO_2 , которые на системном уровне обозначаются как «каскады» напряжения кислорода [542].

Однако применительно к живым биологическим объектам вряд ли можно говорить лишь о пассивной (простой) диффузии кислорода. На разных этапах транспорта кислорода в организме можно встретить многочисленные примеры облегченной диффузии. Следует отметить, что диффузионный перенос кислорода через биологические мембраны изучен хуже по сравнению с другими веществами. Тем не менее можно привести примеры диффузии растворенного кислорода через «поры» гистогематических мембран (мочевой пузырь жабы) и через каналы в клеточной мембране [564, 369]. Возможен перенос кислорода с плазмой через капиллярную стенку за счет гидростатического давления [369]. Хорошо известны роль межклеточной жидкости в транспорте растворенных в ней веществ к клеткам, а также движение гиалоплазмы, ускоряющей не менее чем на порядок поступление кислорода к удаленным от клеточной мембраны частям клетки с низким pO_2 сравнительно с простой диффузией. Такие потоки показаны не только для крупных растительных клеток [25, 184], но и для клеток млекопитающих [24, 521].

Особое место занимает облегченная диффузия, включающая неэнергетический перенос кислорода путем его

связывания с носителем. Классическим примером такого переноса является образование оксигемоглобина в эритроцитах. Другой пример — облегченная диффузия кислорода в клетках мышечной ткани, осуществляемая миоглобином — белком, во многом сходным с гемоглобином, но имеющим лишь один центр связывания с кислородом. В обычных условиях миоглобин образует лабильный комплекс с кислородом. Последний высвобождается при снижении pO_2 в клетке. Это имеет место, например, при активной физической нагрузке, когда скорость дыхания в мышцах резко возрастает. Значительная часть кислорода переносится на цитохромоксидазу миоглобином [243, 377, 500]. Таким образом, в этом случае происходит объединение двух процессов: облегченной диффузии и депонирования кислорода, что позволяет стабилизировать pO_2 в клетке подобно тому, как это происходит в эритроците. То же самое имеет место при сниженных значениях pO_2 . В области 0—5 мм рт. ст. миоглобин поставляет клетке до 40% кислорода [500].

Необходимость миоглобина для функционирования системы внутриклеточного депонирования кислорода показана и для нейрона моллюска [27]. Однако в этих клетках миоглобин функционирует вместе с каротиноидами — веществами, широко распространенными в природе и представляющими собой цепочки этиленовых сопряженных связей, имеющих большое количество ненасыщенных двойных связей. Высокая ненасыщенность позволяет этим соединениям связывать кислород и является причиной их донорно-акцепторных свойств. Последнее, в свою очередь, позволяет им принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в клетках животных. При низкой метаболической активности клетки (и поэтому малой скорости потребления кислорода дыхательной цепью) избыточная часть кислорода может запасаться каротиноидами посредством использования ненасыщенных двойных связей. Предполагается, что перенос O_2 от каротиноидов к цитохромоксидазе осуществляется с помощью миоглобина. Липофусциновые гранулы в нейронах теплокровных животных, содержащие в своем составе каротиноиды, миоглобин и некоторые окислительные ферменты (флавопротеиды, гемопротеиды), также, видимо, выполняют двойную функцию: внутриклеточного депонирования кислорода и его переноса на цитохромоксидазу в условиях сниженного pO_2 [27].

В качестве еще одного, правда спорного, претендента на роль внутриклеточного переносчика кислорода в ткани печени выдвигается цитохром P-450 [368, 455], с которым кислород может образовывать комплекс. Предполагается, что некоторая часть этого пигмента может облегчать транспорт кислорода тогда, когда он не выполняет специфическую функцию в реакциях микросомального окисления. Реальность выдвинутой гипотезы дискутируется. Вполне вероятно, однако, что существуют и другие, пока еще неизвестные возможности образования комплексов кислорода с внутриклеточными пигментами по типу гемоглобина [368].

В настоящее время трудно и даже невозможно оценить количественный вклад облегченной диффузии в перенос кислорода. Этот вопрос никем не исследовался ни теоретически, ни экспериментально. Несомненно одно: в биологических системах могут существовать неэнергозависимые механизмы транспорта кислорода, которые способны увеличить (сравнительно с пассивной диффузией) количество этого газа, доставляемого в клетку. Приведенные выше факты, в свою очередь, свидетельствуют о том, что вопрос об облегченной диффузии кислорода не может быть снят с повестки дня и требует тщательного изучения.

Еще одной принципиальной особенностью живой системы является то, что транспорт кислорода к клетке на всех его этапах, включая и диффузионный, — регулируемый процесс. Диффузия кислорода к клетке определяется прежде всего потребностями кислород — зависимых метаболических систем (регуляция на клеточном уровне). Главной среди них является система митохондриального окисления. Экспериментально установлено, что последний наиболее количественно значимый «каскад» напряжения кислорода находится на участке внеклеточная жидкость — митохондрии [155, 316]. В то же время потребности клетки в кислороде, а следовательно, и его перенос тесно связаны с функциональным состоянием организма. Об этом свидетельствует зависимость коэффициента диффузии кислорода не только от чисто физических факторов, таких, как температура и содержание воды в тканях, но и от типа ткани, особенностей структуры клеточной мембраны, и, наконец, самое главное, от функционального состояния ткани [12, 30, 172, 257, 417, 525, 542, 596].

Диффузионный участок в транспорте кислорода, в свою очередь, тесно сопряжен с регуляцией на системном уровне,

которая включает комплекс реакций, обеспечивающих адекватную доставку O_2 . В своей монографии К. П. Иванов и Ю. А. Кисляков [24] приходят к выводу о том, что транспорт кислорода в клетку находится под контролем и обеспечивается изменением скорости кровотока, сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, увеличением концентрации гемоглобина в крови и увеличением плотности капиллярной сети. Все эти механизмы системной регуляции позволяют поддерживать в условиях сниженного pO_2 в крови величину внутриклеточного pO_2 на уровне нормы. В целом создаются точно отрегулированные и сбалансированные условия, обеспечивающие увеличение эффективности транспорта кислорода в клетку, сравнительно с пассивной диффузией. Нам представляется достаточно точным определение транспорта кислорода в биологических системах как кинетически диффузионного процесса, предложенное В. А. Березовским [10]. Этот термин удачно отражает различия, которые могут проявляться в живых объектах сравнительно с физическими системами.

НАПРЯЖЕНИЕ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

Обеспечение организма кислородом начинается с акта дыхания. Поэтому суммарное потребление кислорода целым организмом, рассчитанное на единицу веса (QO_2), принимается в качестве некоторого обобщенного показателя, характеризующего состояние кислородного (энергетического) обмена в организме. В эволюционном ряду животных имеется общая закономерность снижения QO_2 с увеличением размеров тела (веса). Потребление кислорода организмом зависит от его функционального состояния. У насекомых скорость поглощения кислорода во время полета меняется в десятки и даже сотни раз [107], у птиц — в 5–10 раз [94]. Таков же порядок изменений у человека при интенсивной физической нагрузке по сравнению с покоем [94]. Состояние покоя, в свою очередь, является понятием чрезвычайно условным и имеет разную функциональную значимость (например, для животного во время зимней спячки или в летний период), поэтому оно может характеризоваться различным уровнем потребления кислорода. Любое изменение функциональной активности организма — наступление половой зрелости, изменение температуры тела, условий содержания и кормления и т. д.,

как правило, коррелирует с изменением внешнего дыхания [469].

Естественно, что этот интегральный показатель не дает никакого представления об интенсивности кислородного обмена в отдельных органах и тканях у одного и того же организма, а также об изменениях транспорта кислорода к ним.

QO_2 органов и тканей также представляется малоинформативным параметром, не связанным с их абсолютными и относительными размерами. Например, наибольшую массу (% от общего веса тела) у человека составляют скелетные мышцы. Однако они характеризуются очень низкой абсолютной скоростью дыхания. Сердце и почка имеют примерно один и тот же вес, но потребление кислорода в первом случае примерно в три раза больше, чем во втором, и т. д. (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что скорость кровотока тоже не может быть использована в качестве показателя обеспеченности тканей кислородом, так как она далеко не всегда коррелирует со скоростью его потребления данной тканью. Так, среди перечисленных тканей наибольшей скоростью кровотока характеризуются легкие, но утилизация кислорода собственно легочной тканью значительно меньше, чем во многих других тканях, имеющих сравнительно

Таблица 2. Снабжение кислородом тканей человека (весом 70 кг) (рассчитано на основании данных [94])

Ткань	Вес органа, % от общего веса тела	Потребление O_2 в покое, % от QO_2 для всего организма	Потребление O_2 органом в покое, мл/кг·мин	Потребление O_2 органом в покое, мл/кг·белка·мин	Скорость кровотока, мл/мин
Скелетная мышца	40	25	2,8	0,014	1200
Кожа	10	2	0,6	0,005	500
Пищеварительный тракт	4	19	22,3	0,18	1400
Печень	20–28	20–28	44,1	0,20	1500
Мозг	4	15–20	30,6	0,30	750
Сердце	0,4	9	90,0	0,90	250
Почка	0,4	5	53,0	0,32	1100
Легкие	1,4	4	12,0	0,08	5000

более низкую скорость кровотока. Почка и скелетная мышца имеют приблизительно равную скорость кровотока, но принципиально различаются по скоростям тканевого дыхания; то же относится к мозгу и коже. Таким образом, ни общий вес тела, ни площадь его свободной поверхности, так же как площадь поверхности дыхательных органов, площадь капилляров, и скорость кровотока, не могут сами по себе служить показателями, отражающими в конечном итоге обеспеченность ткани кислородом. Мерой эффективности снабжения тканей кислородом могло бы быть, по-видимому, напряжение кислорода (pO_2) в самой клетке и в межклеточной жидкости либо в притекающей и оттекающей от клетки крови. Однако в настоящее время такого рода определение pO_2 представляет значительные методические трудности. Для практических целей, как правило, пользуются полярографическим измерением тканевого pO_2 , которое представляет собой интегральную величину, отражающую напряжение кислорода в клетке, в межклеточной жидкости и в сосудах кровеносной системы. Эта величина дает некоторое представление о локализации участков с разным снабжением кислородом и о закономерности их распределения, необходимое для понимания механизма транспорта кислорода, а также для оценки эффективности снабжения тканей кислородом и их метаболического статуса. Измерение распределения тканевого pO_2 с помощью микроэлектродной полярографической техники показало, что между отдельными точками в ткани существует большой диапазон градиента pO_2 , который может быть наглядно представлен в виде гистограмм напряжения кислорода [10, 329 581]. Характерные распределения pO_2 в различных тканях приведены на рис. 1. Видно, что поля распределения обладают явно выраженной тканевой специфичностью, которая отражается на средних значениях pO_2 (например, для серого вещества мозга они больше, чем для белого, — 30 и 13 мм рт. ст. соответственно [10]). Общая эффективность снабжения тканей кислородом будет определяться, по-видимому, соотношением количества участков ткани с минимальным и максимальным pO_2 . Очевидно, она должна быть выше при минимальном содержании зон с низким pO_2 .

Имеется тесная связь между распределением pO_2 в тканях и функциональным состоянием [10, 58, 329, 513]. Например, при миозите — заболевании, сопровождающемся

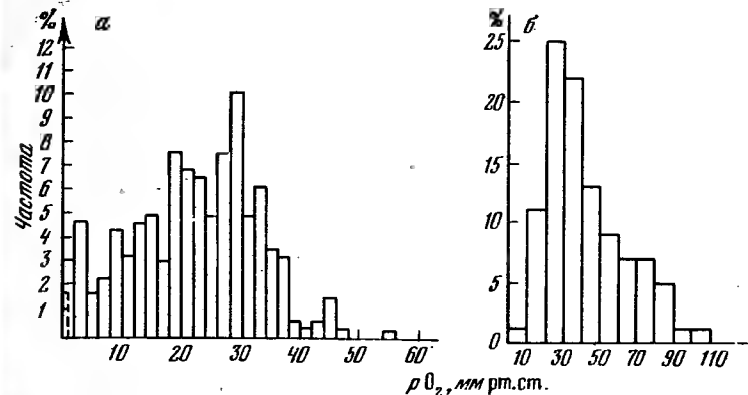


Рис. 1. Гистограммы распределения pO_2 в тканях
а — печень [329]; б — почка [378]

некрозом и лизисом мышечных фибрилл, среднее значение pO_2 уменьшалось от 38 до 23 мм рт. ст., а мода распределения была смещена в сторону низких pO_2 (рис. 2). Это говорит о снижении напряжения кислорода в большей части ткани, что, в свою очередь, может быть вызвано более высокой скоростью поглощения кислорода в миопатической мышце. Другим примером может служить возникающая вслед за подъемом белых крыс на высоту свыше 3000 м гипоксия, которая снижала величину тканевого pO_2 в коре головного мозга приблизительно на 50% [10]. Среднее значение pO_2 в печени при аналогичном воздействии уменьшалось также примерно на 50% [10].

Напряжение кислорода в ткани может определять ее реакцию на последующие воздействия. Снижение pO_2 ока-

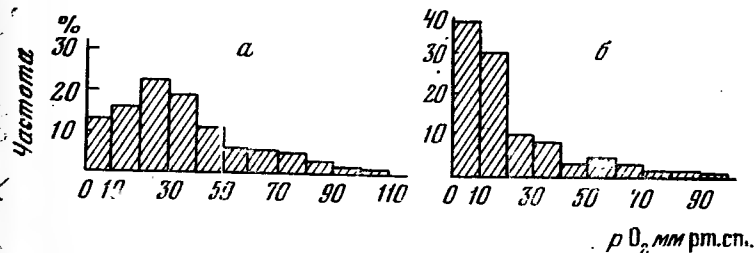


Рис. 2. Гистограмма распределения pO_2 в нормальной мышце (а) и при миозите (б) [377]

зывает угнетающее влияние на величину потенциала действия в коре головного мозга. При этом значение pO_2 , на фоне которого потенциал действия не наблюдается, может снижаться в 10 раз (от 20 до 2 мм рт. ст.) в зависимости от начального уровня pO_2 [6]. Получен большой экспериментальный материал, устанавливающий корреляцию между ЭКГ, напряжением кислорода и редокс-состоянием дыхательной цепи митохондрий [147, 391]. Результаты, полученные *in vitro*, хорошо совпадают с данными на животных в условиях снижения общего артериального давления, скорости кровотока, частоты вентиляции [378]. Таким образом, тканевое pO_2 прямо связано с функциональным состоянием ткани и тканевым дыханием.

Показано, что существует тесная корреляция между видом гистограмм pO_2 в перфузируемых органах и скоростью перфузии [330, 378]. Изменения последней влияют на картину распределения pO_2 как по диапазону значений, так и по виду. При этом обнаруживаются точки, в которых величина pO_2 может быть более низкой, чем в оттекающей жидкости. Число таких участков убывает по мере увеличения скорости перфузии ткани [329, 378, 379]. Из этого можно было бы сделать вывод, что pO_2 ткани в значительной степени отражает изменения, связанные с напряжением кислорода в кровеносной системе. Однако, видимо, это не совсем так. Чансом и сотрудниками [466], например, показано, что аноксические зоны в ткани могут наблюдаться даже при умеренном снижении артериального pO_2 и что они связаны с разделением клеток на функционирующие и нефункционирующие.

Очень показательное сопоставление соотношения количества капилляров в различных тканях и среднетканевого pO_2 . Известно, что капилляризация ткани мозга примерно в 7–8 раз меньше, чем в печени (объем капилляров в этих органах составляет 2,2 и 16,8% от общего соответственно) [77]. Следовательно, можно было бы ожидать, что среднее pO_2 мозга будет существенно меньше, чем в печени. Однако, как видно из табл. 3, оно либо приблизительно равно ему (кошка, собака), либо даже больше (кролик).

Существуют и более прямые доказательства того, что изменение средних значений тканевого pO_2 и вида гистограмм может не только зависеть от капиллярного кровотока, но и быть отражением внутри- и околочелочного напряжения кислорода. Возможность различий в

Таблица 3. Значения среднего pO_2 (мм рт. ст.) в тканях разных животных [10]

Ткань	Кролик	Собака	Кошка
Печень	11,8	32,5	18,4
Мышцы	26,2	27,4	29,1
Мозг (кора)	30,2	29,8	22,5

значениях внутриклеточного pO_2 между клетками, принадлежащими к одной и той же популяции, подтверждается экспериментально [466]. Содержание кислорода в изолированных клетках регулируется. В мертвых оно выше, чем в живых [369]. Ингибиторы дыхания увеличивают внутриклеточное pO_2 . Распределение кислорода в клетке также отличается гетерогенностью. С помощью индикатора кислорода — пиренбутировой кислоты — удалось показать мозаичную локализацию кислорода в клетке, подверженную ритмическим колебаниям [369]. Колебания, истолкованные как отражение дыхания клетки, были зарегистрированы и в околочелочной жидкости в непосредственной близости от мембраны нейрона.

Феноменологически физиологам уже давно хорошо известно, что снижение pO_2 в мышце приводит к изменению просвета капиллярных сосудов, пронизывающих ткань [39]. Этот факт рассматривался как указание на существование механизма авторегуляции напряжения кислорода на тканевом уровне [102, 103, 378]. Развитие этих идей отражено в работах Хилла, в которых изучались корреляционные отношения между уровнем напряжения кислорода, скоростью его поглощения, метаболизмом и сократительной способностью мышечной ткани в условиях *in situ* и *in vitro* [282]. Возможность авторегулирования pO_2 была показана и для нервной ткани во время непродолжительного периода гипоксической гипоксии: при уменьшении pO_2 в артериальной крови тканевое pO_2 вначале снижается, а затем быстро наступает реоксидация, в ходе которой величина тканевого pO_2 возвращается к норме или выходит на плато, несмотря на очень низкие значения артериального pO_2 ; более того, тканевое pO_2 в этих условиях может полностью нормализоваться или даже превысить исходное значение pO_2 (кислородный овершут). Уменьшение pO_2 вызывает быстрое изменение

мозгового кровотока, что может рассматриваться как компенсаторная реакция ткани на дефицит кислорода. Локальная электрическая активность угнетается в районе пониженных значений тканевого pO_2 [102, 391]. Таким образом, изменение активности ткани и связанное с ним изменение метаболизма в определенной степени контролируют величину локального pO_2 . Все эти данные говорят о том, что вклад клеточного и окологлобального pO_2 в общую гистограмму тканевого напряжения кислорода может быть существенным. Какова же роль кровотока? В настоящее время сложилось определенное представление о функциональной капиллярной единице [58, 252, 378, 379, 513], в которую входят зона микроциркуляции (100 — 150 мкм) и прилегающие к ней клетки. Локальный кровоток регулируется независимо от регионального и обеспечивает поддержание стационарного pO_2 в режиме заданной работы.

Изменение активности клетки, например ее увеличение, приводит к усилению потребления кислорода. Связанное с этим уменьшение локального pO_2 компенсируется в течение 1 — 3 с увеличением локального кровотока на расстоянии 250 мкм. Предполагается, что передача информации связана с высоко специализированной сенсорной системой, локализованной в стенках артериол и, возможно, в клеточных мембранах [134, 175, 227, 252, 348, 513]. Но в реализации компенсаторной реакции главная роль отводится не кислороду, являющемуся триггером реакции, а другим медиаторам, к которым могут относиться pH, pCO_2 , изменение концентраций ионов, внутриклеточный редокс-потенциал и т. д.

Необходимо отметить, что экспериментально полученные данные о распределении pO_2 в тканях и роли капиллярного кровотока для поддержания кислородного гомеостаза в них подтверждаются с помощью методов математического моделирования. Модельные исследования распределения pO_2 в биологических объектах были впервые предприняты Крогом и Эрлангером в 1918 г. Крогом же впервые было предложено понятие «тканевого цилиндра» [346]. Уравнение Крога—Эрлангера широко использовалось и продолжает применяться для практических расчетов распределения pO_2 в тканях при различных физиологических условиях. Несмотря на целый ряд допущений, которые Крог вынужден был принять (диффузия кислорода происходит только в радиальном направлении; радиальный градиент концентраций кислорода в крови внутри

капилляра незначителен; изменение общего содержания кислорода в капиллярах в направлении от артерии к вене является линейной функцией длины капилляра; ткань вокруг капилляра рассматривается как однородная среда; скорость потребления кислорода не зависит от его концентрации; концентрации кислорода в артериальном и венозном конце капилляра стационарны), все выводы в первом приближении согласуются с полученными позднее экспериментальными данными. Одним из очень важных следствий, вытекающих из работ Крога, было установление высокого (до нескольких десятков миллиметров ртутного столба) градиента напряжения кислорода между различными точками в ткани. А это, в свою очередь, предполагает возможность существования различий в содержании кислорода в близлежащих клетках. Таким образом, была предсказана мозаичность распределения pO_2 .

Более поздние модели позволили снять ряд допущений, принятых Крогом, и приблизить условия к реально существующим. Подробный анализ различных этапов математического моделирования условий оксигенации тканей приведен в ряде монографий [24, 31]. Не останавливаясь на их детализации, следует лишь отметить, что важным результатом более поздних модельных исследований являются связь распределения pO_2 в тканях с гемодинамическими факторами и изучение этих процессов с помощью пространственных моделей, которые в отличие от одномерной модели Крога более полно учитывают и точно отображают условия газообмена в капиллярах. Имеются модели, позволяющие учитывать гетерогенность тканей и оценить средние уровни pO_2 в клетках. Особенно плодотворным следует считать сочетание экспериментального подхода с математическим моделированием. Именно благодаря им было развито представление об автономной микроциркуляторной системе регуляции локального pO_2 в тканях [58, 379, 513]. Математическая модель диффузии кислорода, использованная К. П. Ивановым и Ю. Я. Кисляковым [24], подкрепляемая исследованиями закономерностей распределения напряжения кислорода в тканях головного мозга с помощью микроэлектродной техники, позволила им установить ряд принципиально новых положений. Они показали, что благодаря сходящимся потокам кислорода создается возможность довольно равномерного распределения pO_2 , обеспечивающего благоприятные условия для дыхания нервных клеток. Расчеты показали, что даже при

очень высоком уровне потребления кислорода нервной клеткой она полностью насыщена кислородом. Ими же были найдены новые капиллярные конструкции, обеспечивающие более эффективное (в 2—3 раза) снабжение клетки кислородом сравнительно с одиночной одномерной капиллярной ячейкой. Наконец, удалось считать, что от нейрона к прекапилляру должны устремляться потоки CO_2 , достаточно мощные с точки зрения регуляции капиллярного кровотока.

Изучение распределения парциального давления кислорода в тканях, как экспериментальное, так и проводимое с помощью методов математического моделирования, имеет большое значение для современной физиологии тканей. Оно позволяет не только определить величину предельных значений pO_2 в венозной и артериальной крови, необходимую для нормального функционирования ткани, и оценить последствия снижения уровня кислородного обеспечения при различных патологиях, но и проанализировать самые сложные сочетания благоприятных и неблагоприятных факторов, от которых зависит тканевое дыхание, а также выделить главные компоненты, участвующие в его регуляции. В то же время следует отметить, что успешное решение этих вопросов возможно лишь при комплексной регистрации не только тканевого pO_2 , но и других параметров, с которыми он может тесно коррелировать (скорости кровотока, изменения pH, концентрации различных ионов, pCO_2 и др.).

Проблема микроавторегуляции тканевого pO_2 прямо связана с вопросом о клеточной рецепции кислорода, который периодически поднимается в литературе на протяжении последних 40 лет. Современные представления по этому вопросу сводятся к следующему. В кровяном русле существует специализированная система клеток-хеморецепторов, которые могут либо осуществлять централизованную сигнализацию об изменении pO_2 путем передачи сигнала через дыхательный центр к эффекторной моторной системе (сिनускаротидные зоны кровеносных сосудов) [348], либо непосредственно реагировать на содержание кислорода в окружающей среде без участия нервных элементов и обеспечивать формирование ответной компенсаторной реакции (гладкие мышечные ткани сосудов типа ductus arteriosus) [175, 227, 263]. Благодаря этой рецепторной системе артериальное pO_2 поддерживается в пределах 90—100 мм рт. ст., а в артериолах, капиллярах и вену-

лах — на уровне 50 мм рт. ст. и менее. Однако вне капиллярного русла действуют клеточные механизмы регистрации сигнала об изменении pO_2 и цепь связанных с этим ответных реакций. В этом случае можно, видимо, говорить о молекулярных «сенсорах» кислорода [309, 313]. Система рецепции, выполняющая контрольную функцию по отношению к внемитохондриальному содержанию кислорода, описана для нервных клеток апплизи [134]. Предполагается, что ответственным за чувствительность к pO_2 является состояние плазматической мембраны клетки. К такому же выводу приходят и другие исследователи, считая, что для осуществления контроля дыхания клетки необходимо поддержание целостности плазматической мембраны [175, 227, 348]. Только в этом случае обеспечивается поддержание специфической функции клетки в достаточно широком диапазоне значений pO_2 .

Это положение находится в противоречии с точкой зрения, что клеточная мембрана вряд ли может играть существенное значение в «рецепции» кислорода, так как он обладает свойствами, обеспечивающими ему возможность достаточно легко проникать через нее. В пользу этого как будто бы свидетельствуют факты об отсутствии градиента напряжения на плазматической мембране изолированных клеток печени [155, 316]; этот градиент существует, по полученным данным, лишь на митохондриальной мембране.

Следует, однако, отметить, что состояние проницаемости плазматических мембран, изолированных из ткани клеток, может отличаться от такового *in vivo* особенно в первый час после выделения и это может привести к ошибочным выводам. Если все же это так, то что же может выступать в роли «рецептора» кислорода в клетке? Наиболее вероятными кандидатами на роль «кислородных сенсоров» в клетке являются ферменты, катализирующие реакцию восстановления молекулярного кислорода, т. е. оксигеназы и оксидазы. Очевидно, преимущества будут за теми из них, которые обладают наибольшим сродством к кислороду, что позволит им выступать в роли регуляторов в области наиболее низких pO_2 . Поэтому главными претендентами могут быть ферменты терминальных цепей: цитохромоксидаза и цитохром P-450. Последний, однако, неравномерно распределен в организме. Его очень много в печени, но есть клетки (нейроны, полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги и др.), где обнаружены лишь его

следы. Тем не менее чувствительность к кислородной недостаточности нейронов очень высока. Поэтому цитохром P-450, видимо, не может быть универсальным внутриклеточным рецептором. Этой роли в большей степени соответствует цитохромоксидаза [309, 313]. Она обладает наиболее высоким сродством к кислороду среди других оксидаз (см. ниже табл. 5). Но если внутриклеточные ферментные системы с высоким сродством к кислороду регулируют его поступление в клетку в связи с необходимостью использования кислорода во внутриклеточных метаболических процессах, то напрашивается вывод, что диффузионные ограничения вряд ли играют существенную роль в этом процессе.

ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ ДЫХАНИЯ ОТ pO_2

Способность реагировать на изменения парциального давления кислорода в окружающем воздухе свойственна большинству аэробов (начиная с одноклеточных). В процессе эволюции увеличивалась чувствительность организмов к недостатку кислорода и одновременно совершенствовались механизмы, ответственные за поддержание кислородного гомеостаза. В результате этого у млекопитающих уже имеется сложная система компенсаторных реакций, благодаря которым обеспечивается поддержание стационарного уровня кислорода в капиллярах, необходимого для наиболее эффективного снабжения им тканей и клеток. На системном уровне это условие выполняется за счет трех основных факторов [24]: 1) изменение скорости кровотока в капиллярах; 2) депонирование кислорода в эритроцитах; 3) изменение свойств кривой диссоциации оксигемоглобина, которая отражает способности гемоглобина насыщаться кислородом в легких и отдавать его в тканях. Приведение в действие этих трех факторов, которые реально увеличивают содержание кислорода в капиллярах крови и тем самым ускоряют процесс его диффузии, осуществляется за счет усиления функции органов внешнего дыхания, кровообращения, выброса форменных элементов крови и пр. Все эти компенсаторные реакции являются важнейшими приспособительными механизмами при недостатке кислорода. Таким образом, в ответной реакции целого организма на снижение pO_2 участвуют наиболее жизненно важные системы, что делает чрезвычай-

но затруднительным выбор критериев для оценки его чувствительности к кислородной недостаточности.

Неприятные субъективные ощущения у людей появляются при снижении pO_2 воздуха до 25–42 мм рт. ст., что соответствует уменьшению содержания кислорода в воздухе на 50–80%. Е. А. Коваленко и И. Н. Черняков предлагают классифицировать чувствительность различных функциональных систем к кислороду в зависимости от уровня pO_2 артериальной крови. Они выделяют четыре степени тяжести развития гипоксии [31].

I степень — $pO_2=60-45$ мм рт. ст. (высота 4870 м): первые видимые признаки со стороны пульса и дыхания, нарушение мышечной координации.

II степень — $pO_2=50-40$ мм рт. ст. (высота 7550 м): предкоматозное состояние, нарушение психики и эмоций, шатающаяся походка, ослабление и потеря чувствительности, сердечная слабость от мышечных усилий.

III степень — $pO_2=40-20$ мм рт. ст. (высота 10 653 м): бессознательное состояние, церебральная кома, ригидность мышц, «стеклянные глаза», может произойти остановка сердца. Симптомы проходят при вдыхании кислорода.

IV степень — $pO_2=20$ мм рт. ст. (высота более 11 000 м): кома, дыхание крайне замедленное или остановка дыхания, смерть.

Из приведенных данных видно, что в ответную реакцию организма на недостаток кислорода постепенно включаются самые разные физиологические функции. Летальным является pO_2 , равное нескольким десяткам миллиметров ртутного столба. Однако различные органы обладают неодинаковой чувствительностью к недостатку кислорода. Так, например, снижение амплитуды основных регулярных волн ЭЭГ коры головного мозга вплоть до полного их исчезновения происходит при $pO_2=60-70$ мм рт. ст., т. е. когда содержание кислорода в воздухе уменьшается на 60% [1]. Известно, что белое вещество мозга менее чувствительно к кислородной недостаточности. Хеморецепторы сосудов миокарда перестают реагировать на такой сильно действующий спазмолитик, как нитроглицерин, при уменьшении pO_2 до 40 мм рт. ст. (снижение содержания кислорода во вдыхаемом воздухе на 75%) [185]. Таким образом, нарушение функциональной активности органов наблюдается также при сравнительно высоких значениях pO_2 .

В отличие от этого дыхательная активность целого организма высших животных, его органов и тканей, а также клеточных систем не уменьшается в широких пределах значений pO_2 . Это положение вошло в физиологическую литературу под названием «правила Пфлюгера». Потребление кислорода целым организмом начинает снижаться только при крайне резкой гипоксии вместе с падением температуры тела. Более того, на определенных ее ранних стадиях возможно даже усиление общего дыхания (как и потребления кислорода органами и клетками). Вывод о независимости скорости дыхания от pO_2 был подтвержден Варбургом [574, 575] на яйцах морского ежа и микроорганизмах и долгое время считался аксиомой. Лишь в 1933 г. Танг [533] внес в этот вопрос коррекцию, показав, что скорость дыхания и pO_2 связаны зависимостью типа гиперболической. Развивая эти представления, Бэндер и Киссе [93] нашли, что в митохондриях, дрожжах и бактериях скорость дыхания подчиняется следующему уравнению:

$$V = \frac{V_{\text{макс}} (pO_2)^n}{K_m + pO_2^n}, \quad (3)$$

где $V_{\text{макс}}$ — максимальная скорость дыхания; K_m — концентрация кислорода, при которой скорость дыхания полумаксимальна; n — показатель степени.

Было найдено, что n для митохондрий сердца и срезов печени равно 1,4; для асцитных клеток — 1,7. Близкие к этим значениям n были получены и другими исследователями. Из этого следовало, что зависимость скорости дыхания от pO_2 подчиняется кинетике, сходной с кинетикой ферментативных реакций, описываемых уравнением Михаэлиса — Ментена (уравнение (3) при $n=1$). Лонгмюр [366] уточнил, что такая зависимость проявляется при скорости дыхания, равной 10–90% от максимальной.

В связи с этими исследованиями в научную терминологию прочно вошли понятия о критическом напряжении кислорода (значения pO_2 , при которых начинаются изменения дыхания — K_{po}) и о величине pO_2 , при которой дыхание биологического объекта уменьшается на 50% (кажущаяся константа Михаэлиса — $K_m(O)$). Определение K_{po} и $K_m(O)$ на уровне целого организма или отдельных органов представляет значительные трудности, так как слишком велико влияние гемодинамики и общего дыхания.

Таблица 4. Значения $K_m(O)$ для митохондрий и разных типов клеток

Объект	$K_m(O)$, м	Источник
Митохондрии мозга (1 мМ K^+)	$2 \cdot 10^{-8}$ – $1,2 \cdot 10^{-7}$	[173]
Митохондрии мозга (5–150 мМ K^+)	$5,0 \cdot 10^{-7}$	[196]
Митохондрии печени (1 мМ K^+)	$5,0 \cdot 10^{-7}$	[196]
Клетки печени (свежевыделенные)	$1 \cdot 10^{-6}$ – $1,9 \cdot 10^{-6}$	[316, 366]
Клетки почек (в культуре)	10^{-6}	
Нейробластома (клетки в культуре)	10^{-6}	[596]
Tetrahymena p.	$2 \cdot 10^{-6}$	
Candida utulis	$7 \cdot 10^{-7}$	
без глюкозы	$4 \cdot 10^{-6}$	
с глюкозой		

Однако для тканевых срезов, клеток, изолированных органелл и ферментных систем их измерение возможно (см. табл. 4).

Табл. составлена на основании полярографических данных последних лет. Так как метод определения и способ получения объекта сильно влияют на исследуемую величину, которая зависит также от условий инкубации, температурного режима и прочих причин, ранние данные отличаются более высокими значениями $K_m(O)$. Из табл. 4 видно, что условия инкубации (солевой состав, субстрат окисления) существенно меняют $K_m(O)$.

Следует еще раз обратить внимание на существенную разницу между теми значениями pO_2 , которые приводили к нарушениям дыхания на уровне целого организма (десятки миллиметров ртутного столба), и величинами K_{po} и $K_m(O)$ для одиночных клеток и ферментов (миллиметры или доли миллиметров ртутного столба). Это связано, видимо, с тем, что чувствительность последних к недостатку кислорода определяется главным образом сродством к нему их кислородзависимых ферментных систем, которые могут быть молекулярными «сенсорами» кислорода в клетке.

Обращает на себя внимание, что все свободно живущие клетки или клетки, адаптированные к существованию вне организма (культура), имеют значительно более низкие $K_m(O)$ (на порядок) по сравнению с клетками тканей. Раз-

нища в значениях KpO и $K_M(O)$ для клеток и изолированных митохондрий также существует. В связи с этим напрашивается вывод, противоречащий фактам, полученным Чансом, о существовании концентрационного градиента кислорода между внеклеточной и внутриклеточной средой, свидетельствующего о диффузионных ограничениях поступления O_2 в клетку. Так, на агрегированных и неагрегированных клетках было установлено, что $K_M(O)$ может зависеть от размеров объекта [18]:

$$K_M(O) = Ad^x, \quad (4)$$

где d — средний диаметр клетки; A — константа; показатель x близок к 0,7.

Но если это так, то следует ожидать, что диффузионные ограничения должны будут очень сильно проявляться в тканевых препаратах, например в срезах. Об этом как будто бы свидетельствуют и значения абсолютных скоростей потребления кислорода: для срезов они значительно меньше (в 2 раза), чем для клеток и тем более для митохондрий. Поскольку у последних дыхание остается неизменным вплоть до очень низких значений pO_2 , можно предполагать, что диффузия кислорода в глубь тканевой структуры будет сопровождаться постепенным уменьшением его концентрации по мере удаления от поверхности среза, а это может сказываться на скорости его дыхания.

$K_M(O)$ не является фиксированным параметром. дыхательной цепи митохондрий и линейно связана с максимальной скоростью дыхания [491]:

$$K_M(O) = \frac{rTN}{4K_1}, \quad (5)$$

где $r=0,65$ [491]; TN — число оборотов (активность каталитического центра) оксидазы (число электронов на 1 моль цитохромов a , a_3); K_1 — константа скорости ($M^{-1} \cdot c^{-1}$) для реакции цитохрома a_3 с кислородом. В интактных митохондриях $K_M(O)$ зависит также от энергетического состояния [12, 172, 196, 459, 491, 525]. В присутствии высоких концентраций АТФ/АДФ (состояние 4, см, гл. 2) $K_M(O)$ значительно выше, чем в присутствии разобщителей. При низких отношениях $[АТФ]/[АДФ]$ $[Ф_n]$ она равна 0,01 мМ, а при высоких — 0,3 мМ. В зависимости от концентрации калия в среде инкубации $K_M(O)$ может изменяться в пределах 0,02–0,2 мМ [172, 173, 196], и это коррелирует с изменением KpO . При переходе митохонд-

рий от состояния 4 к состоянию 3 по Чансу KpO также изменяется от 5,9 до 11,3 мМ [12, 141]. Все эти изменения либо свидетельствуют об изменении кинетических характеристик лимитирующей стадии дыхания, либо указывают на то, что меняется лимитирующая стадия всего процесса.

В интактной клетке система утилизации кислорода значительно сложнее, чем в изолированных митохондриях. Несмотря на то что большая часть кислорода потребляется дыхательной цепью, величина $K_M(O)$, измеренная для целой клетки, не может быть показателем только митохондриального дыхания. Помимо цитохромоксидазы, как уже указывалось, в клетке имеется большое количество оксидаз и оксигеназ, обладающих различным сродством к кислороду. Их удельный вклад зависит от направленности метаболических процессов в клетке (см. ниже), и поэтому $K_M(O)$ для нее должна рассматриваться как некий интегральный параметр, отражающий изменение кинетических характеристик ферментных систем в процессах, связанных с потреблением кислорода. В то же время нельзя не учитывать диффузионные моменты, связанные с наличием концентрационного градиента для кислорода на клеточной мембране. Они также могут влиять на KpO и видимую $K_M(O)$ клетки и увеличивать их по сравнению с митохондриями. (Именно такие соображения руководили Лонгмюром, когда он начал заниматься изучением этого вопроса [366, 367].) Но тогда диффузионные ограничения должны увеличиваться в зависимости от размера объекта, и это будет сказываться на $K_M(O)$.

Согласно Варбургу [574, 575], допускавшему, что, во-первых, кислород поступает в срез за счет пассивной диффузии, во-вторых, внутри среза происходит активное поглощение кислорода и, в-третьих, скорость потребления кислорода не зависит от pO_2 , — для прямоугольного среза должна существовать следующая зависимость между диффузией кислорода и его толщиной:

$$p_x = p_0 - \frac{\alpha d^2}{8D_K}, \quad (6)$$

где p_0 — парциальное давление кислорода на поверхности среза; p_x — парциальное давление кислорода в самом глубоком слое среза; α — скорость дыхания всего среза; x — толщина слоя; d — толщина среза; D_K — коэффициент диффузии KpO . При этом максимальная глубина диффузии $h=2DpO_2/\alpha$.

Зависимость V_d/pO_2 описывается уравнением:

$$V_d = 2Aa \left(\frac{2D_K pO_2}{a} \right)^{1/2} \quad (7)$$

где A — объем среза.

Следовательно, напряжение кислорода связано со скоростью дыхания квадратичной зависимостью.

Полученная формула позволила рассчитать толщину срезов, при которой их дыхание не должно ограничиваться диффузией. Она приблизительно равна 0,4 мм. В срезе, имеющем большую толщину, по Варбургу, существуют участки, где скорость дыхания должна быстро снижаться до нуля (гипоксическая зона).

Лонгмюр предпринял специальную проверку этого положения и показал, что реальная ситуация свидетельствует об отклонениях от теории Варбурга [366, 367]. Изменение размеров среза в диапазоне от 0,2 до 1 мм ведет к увеличению критической концентрации кислорода не в 25 раз, а только вдвое [367]. Вид кривой зависимости скорости дыхания среза от концентрации кислорода в среде инкубации неодинаков для срезов (одной толщины), полученных от разных типов тканей. При этом геометрия самого среза мало сказывается на кинетических характеристиках дыхания [565, 566]. Так, кривые зависимости скорости дыхания срезов, приготовленных в виде цилиндра, волокна и плоскопараллельных пластинок, мало различались между собой. Эти факты свидетельствуют о том, что диффузия не является единственным фактором, ограничивающим дыхание срезов. Более того, оказалось, что одинаковые по толщине срезы разных тканей имеют разную кинетику дыхания при уменьшении pO_2 . Применение диффузионной модели для срезов печени плохо согласовывалось с реальными результатами.

Исследования степени восстановленности дыхательных переносчиков в срезах печени, проведенные Ван Россумом [565, 566], также показали, что ограничение дыхания не наступает при их толщине, не превышающей 0,46 мм.

Резюмируя изложенные факты, следует подчеркнуть, что на уровне клеточных систем и тканевых препаратов вопросы, связанные с выяснением механизмов, определяющих зависимость V_d/pO_2 , нельзя считать решенными. Достаточно определенно показано, что проблема не сводится к диффузионным ограничениям поступления кислорода в

ткань. Выяснение же роли метаболической компоненты находится на уровне теоретических расчетов. В связи с этим нам представлялось важным проведение специальных исследований этого вопроса.

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ДЫХАНИЯ ОТ pO_2 В СРЕЗАХ ТКАНЕЙ

Графики, построенные в координатах скорость дыхания срезов — напряжение кислорода, по смыслу аналогичны обычным кинетическим характеристикам ферментных систем. Так же как вид последних, они определяются каталитическими свойствами данного фермента. Вид кривых зависимости V_d/pO_2 тканевых препаратов может быть связан с изменениями метаболической регуляции тканевого дыхания, происходящими по мере убывания кислорода. Тем не менее при анализе получаемых зависимостей V_d/pO_2 для срезов мы исходили из возможности влияния на их вид диффузионных ограничений. При этом снятие диффузионных ограничений различными приемами должно было бы привести к усилению дыхания, и наоборот. Проверка этого положения показала невозможность объяснить полученные результаты с помощью такого подхода.

В рассмотренном выше цикле работ Лонгмюра [366, 367], составляющих основу экспериментального материала по кинетике тканевого дыхания, с целью приближения к условиям стационарного равновесия по кислороду ($dO_2/dt=0$) максимальная скорость дыхания выбиралась достаточно малой. Это предопределяло большую длительность экспериментов при снятии кривых зависимости дыхания от pO_2 в выбранном диапазоне концентраций кислорода.

Между тем время, в течение которого происходит снижение pO_2 в среде, может существенно влиять на характер кривых зависимости V_d/pO_2 . Это было установлено в экспериментах со срезами печени, в которых длительность получения кривой V_d/pO_2 менялась от 12 до 50 мин. Срезы имели приблизительно одинаковую исходную абсолютную скорость дыхания, которая незначительно изменялась за время эксперимента. Следует отметить, что условия проведения длительного эксперимента приближались к тому, что имелось у Лонгмюра. Оказалось, что кривые зависимости существенно отличаются друг от друга. Одна из них линейна, другая нелинейна. Так как формирование и одного и другого вида зависимости происходило без существен-

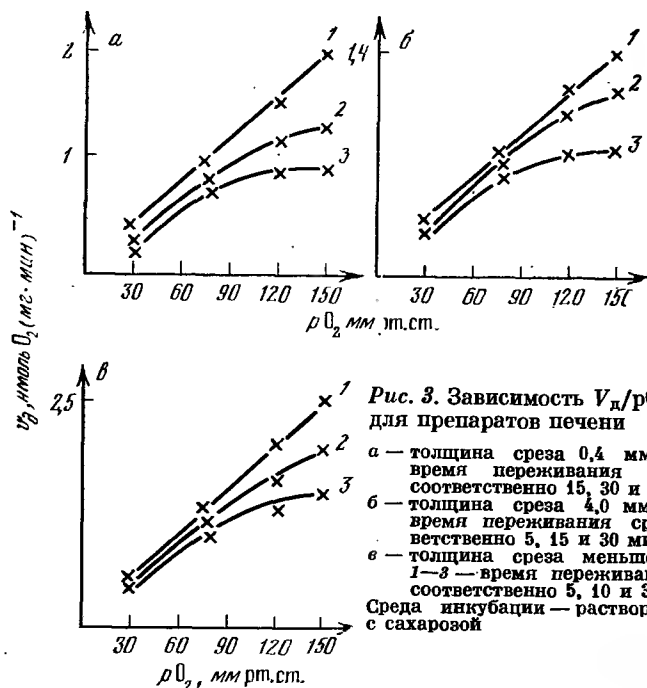


Рис. 3. Зависимость V_d/pO_2 для препаратов печени
 а — толщина среза 0,4 мм: 1—3 — время переживания препарата соответственно 15, 30 и 60 мин;
 б — толщина среза 4,0 мм: 1—3 — время переживания среза соответственно 5, 15 и 30 мин;
 в — толщина среза меньше 0,1 мм: 1—3 — время переживания среза соответственно 5, 10 и 30 мин.
 Среда инкубации — раствор Тиреде с сахарозой

ного изменения скорости абсолютного дыхания, вряд ли оно свидетельствует о различиях в условиях диффузии кислорода в этих случаях. В то же время из этого вытекает, что исследование зависимости V_d/pO_2 должно осуществляться в течение короткого промежутка времени сравнительно со временем переживания тканевых препаратов и при сохранении условий, достаточно близких к стационарному состоянию по кислороду в каждой точке измерения.

Зависимость V_d/pO_2 срезов печени непрерывно меняется с увеличением времени переживания объекта (рис. 3) Если в первые минуты преинкубации, когда для среза характерна очень высокая скорость потребления кислорода, вид зависимости близок к линейному, то с увеличением времени появляется гиперболическая зависимость и уже через 40 мин на участке $pO_2=102-145$ мм рт. ст. имеется отчетливо выраженное плато. Дыхание срезов к этому времени уменьшается в 2—3 раза. Следовательно, и в этом случае на характер зависимости V_d/pO_2 , видимо, влияют не диффузионные ограничения.

Аналогичная картина влияния времени переживания на характер зависимости дыхания от напряжения кислорода наблюдается для срезов разной толщины (см. рис. 3). На эту зависимость не влияет изменение условий для диффузии кислорода в ткань, обусловленное размерами препарата и сопровождающееся уменьшением скорости дыхания в крупных срезах. Тот факт, что с увеличением времени переживания разных срезов, толщина которых различается на два порядка, происходят качественно сходные изменения зависимости V_d/pO_2 (переход от линейности к нелинейности), также свидетельствует о том, что отнюдь не диффузионные ограничения определяют конкретный их вид.

Невозможность объяснения формирования исследуемых зависимостей диффузионными причинами особенно наглядно демонстрируется при исследовании действия различных субстратов. Линейная зависимость V_d/pO_2 становилась нелинейной в присутствии НАД-зависимых субстратов (рис. 4). Еще большее приближение к гиперболической зависимости имело место при окислении сукцината (рис. 5). При этом наблюдалась значительная сравнительно с другими субстратами активация потребления кислорода и видимая $K_m(O)$ существенно уменьшалась. Более того, отношение скоростей дыхания сукцинат-эндогенные субстраты при высоком pO_2 (140—150 мм рт. ст.) было меньше, чем при низких pO_2 (30—60 мм рт. ст.). Т. е. эффективность влияния сукцината на дыхание была больше в области низких значений напряжения кислорода. Таким образом, сукцинат не только превращал линейную зависимость в гиперболическую, но и снижал порог чувствительности препаратов к низким значениям pO_2 , а также имел преимущества в окислении в области низкого pO_2 сравнительно с другими субстратами. Это хорошо согласуется с известными свойствами сукцината, имеющего кинетические преимущества для окисления в условиях увеличения степени восстановленности на участке сукцинат-дегидрогеназа-коэнзим Q, что наблюдается при низких значениях pO_2 .

Большая стимуляция дыхания сукцинатом в области низких pO_2 может быть связана со специфическим именно для него состоянием дыхательного аппарата клетки. Это было бы невозможно, если бы кинетика дыхания определялась только диффузией.

Следовательно, фактором, определяющим вид зависи-

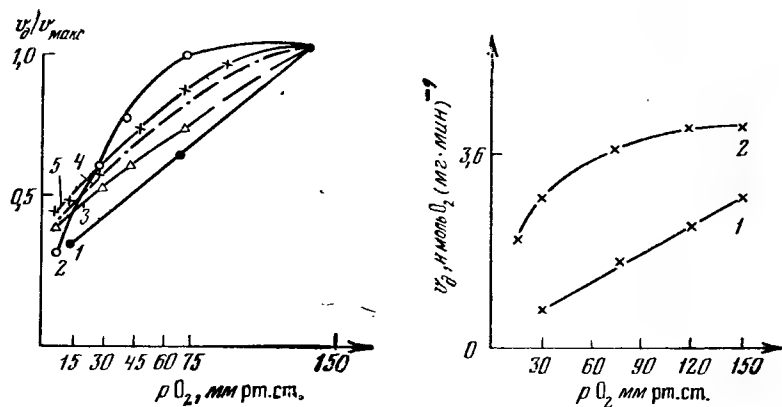


Рис. 4. Влияние субстратов дыхательной цепи на вид зависимости V_d/pO_2 для срезов печени (через 10 мин после экстирпации)

Среда инкубации — раствор Тироде с сахарозой. Субстраты окисления: 1 — эндогенные; 2 — сукцинат; 3 — среда 199; 4 — НАДН; 5 — α -кетоглутарат

Рис. 5. Действие сукцината на зависимость V_d/pO_2 для препаратов печени

Толщина срезов 0,4 мм; 1 — эндогенные субстраты; 2 — сукцинат. Время переживания срезов — 5 мин

мости скорости дыхания от напряжения кислорода, по-видимому, являются особенности метаболизма, связанные с окислением того или иного субстрата, меняющие состояние дыхательной цепи в целом.

Дыхательная цепь играет существенную роль в формировании исследуемой зависимости. Ингибитор терминального участка дыхательной цепи — цианистый калий в концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ М — на 70–80% подавлял дыхание срезов. Это приводило сразу же к появлению линейной зависимости скорости утилизации кислорода цианидрезистентными системами окисления от pO_2 в среде. На нее не влияли субстраты митохондриального окисления или время переживания среза. Так как KCN ингибировал митохондриальное дыхание и остаточное дыхание было связано главным образом с немитохондриальными системами окисления (подробно это рассматривается ниже), логично предположить, что именно они определяют появление новой формы зависимости (рис. 6).

Роль кислородзависимых систем, альтернативных митохондриальной дыхательной цепи, в формировании зави-

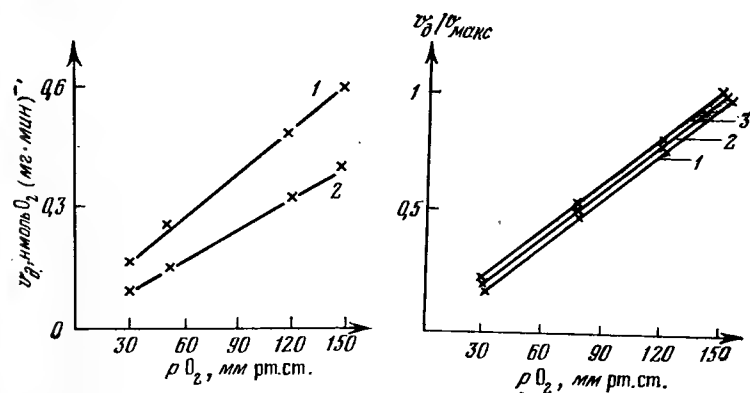


Рис. 6. Зависимость V_d/pO_2 для срезов печени в присутствии 1 mM KCN

Среда инкубации — раствор Тироде с сахарозой. Время переживания срезов: 1 — 5 мин, 2 — 70 мин

Рис. 7. Зависимость V_d/pO_2 срезов печени мышей, получавших фенobarбитал (80 мг/кг) в течение 4 дней

Раствор Тироде с сахарозой. Время переживания срезов: 1 — 15 мин; 2 — 60 мин; 3 — 90 мин

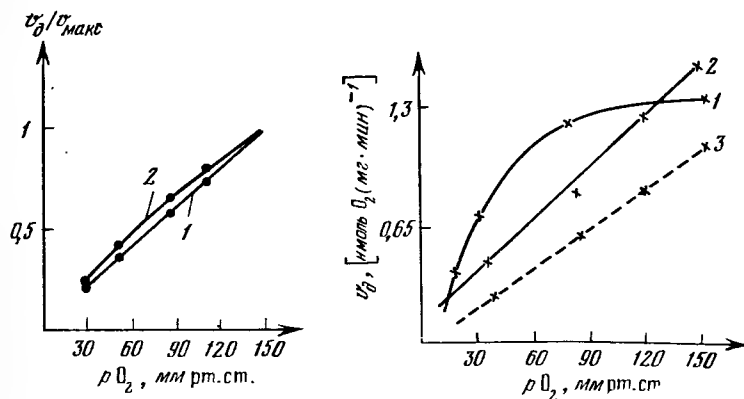


Рис. 8. Действие сукцината на зависимость V_d/pO_2 для срезов печени мышей, забитых через 24 ч после 4-дневной инъекции фенobarбитала (1) и через 72 ч после 3-дневной инъекции фенobarбитала (2)

Время переживания срезов 60 мин

Рис. 9. Влияние адреналина на зависимость V_d/pO_2 для срезов печени

Среда инкубации — раствор Тироде с сахарозой. Время переживания срезов — 50 мин. Субстраты окисления: 1 — эндогенные; 2 — адреналин, $2,5 \cdot 10^{-7}$ М; 3 — адреналин, $7,5 \cdot 10^{-7}$ М

симости V_d/pO_2 подтверждается в опытах на срезах печени животных после трехдневного введения им фенобарбитала. Известно, что последний индуцирует ферменты микросомального окисления, в том числе и цитохром Р-450. Вид исследуемой зависимости у таких срезов не менялся на протяжении всего периода переживания (2 ч), т. е. в отличие от контроля оставался линейным (рис. 7). Внесение субстрата микросомального окисления амидопирина на фоне максимально индуцированной системы микросомального окисления не вносило существенных изменений в эту зависимость, в то время как у контрольных срезов он делал ее нелинейной.

Таким образом, зависимость скорости дыхания от pO_2 отражает изменения метаболического статуса клеток печени, происходящие в результате введения фенобарбитала.

То же самое наблюдалось при окислении срезами сукцината (рис. 8). Последний переставал влиять на зависимость V_d/pO_2 срезов печени животных на фоне как максимальной индукции ферментов микросомального окисления, так и при относительно небольшом увеличении активности ферментов системы микросомального окисления по сравнению с контролем (рис. 8). Это еще раз подтверждает, что линейная зависимость V_d/pO_2 может быть связана с особенностями метаболизма клетки, а не обязательно обусловливаться наличием диффузионных ограничений для кислорода.

Очень показательными в рассматриваемом аспекте оказались опыты с адреналином. Не затрагивая вопрос о механизме его влияния на печень, отметим, что в наших экспериментах действие различных концентраций адреналина могло вызывать либо стимуляцию, либо ингибирование дыхания срезов. Однако оба эти момента не влияли на зависимость V_d/pO_2 , которая в присутствии адреналина имела всегда линейный характер (рис. 9).

Наличие перехода к линейной зависимости в условиях стимуляции дыхания составляет очень важный момент для утверждения, что в формировании вида кривой зависимости скорости дыхания от pO_2 ведущими являются не диффузионные ограничения.

Действие длительной преинкубации и субстратов окисления на зависимость V_d/pO_2 срезов мозга было аналогичным. Таким образом, переход зависимости V_d/pO_2 от линейной к нелинейной, мог происходить на фоне как вы-

сокой скорости утилизации кислорода, так и низкой, на фоне как его интенсификации, так и угнетения. Если бы вид зависимости определялся диффузионными ограничениями O_2 в среде, то переход к нелинейности обозначал бы их снятие и обязательно должен был бы сопровождаться усилением дыхания. И наоборот, подавление дыхания должно было бы говорить о диффузионных ограничениях и приводить к уменьшению нелинейной зависимости. Однако такая корреляция отсутствовала почти во всех опытах.

Резюмируя рассмотренные факты, мы приходим к ряду заключений: 1) форма и толщина срезов не влияют на вид зависимости V_d/pO_2 , что должно было бы быть при проявлении диффузионных ограничений для поступления кислорода в ткань; 2) при равных скоростях дыхания может наблюдаться как линейная, так и гиперболическая зависимость дыхания от pO_2 , т. е. первое опять-таки не связано в этом случае с диффузионными ограничениями; 3) гиперболическая зависимость может проявляться на фоне низкого дыхания и становиться линейной на фоне высокого, следовательно, и в этом случае, линейность не является отражением диффузионных ограничений; 4) субстраты окисления меняют вид зависимости; 5) активация или угнетение того или иного кислородзависимого пути в клетке также меняет вид зависимости. Все это говорит против диффузионных влияний на зависимость V_d/pO_2 и в пользу метаболического ее регулирования.

Сходные результаты были получены на растительных клетках [357]. Переживающие срезы картофеля различной толщины попеременно помещались в воздух и чистый кислород. Дыхание свежих срезов не зависело от их толщины. В противоположность этому дыхание старых срезов было одинаково связано с толщиной срезов в атмосфере как воздуха, так и чистого кислорода. Если бы диффузия определяла скорость утилизации кислорода, то геометрические размеры ткани и концентрация кислорода играли бы важную роль в обоих случаях, а не только для старых срезов.

Линейная зависимость скорости поглощения кислорода ростками риса (длиной 2 см) на ранней стадии созревания позднее переходит в гиперболическую [534, 571].

Итак, представленные выше эксперименты убедительно говорят о том, что для такой искусственно взятой биологической системы, как тканевый срез, где снабжение различных клеточных слоев кислородом, по-видимому, проис-

ходит исключительно за счет его диффузии в ткань из внешней среды последовательно от одного слоя клеток к другому, можно подобрать условия, при которых вид кривой зависимости скорости дыхания от pO_2 не будет определяться ни размером среза, ни скоростью утилизации O_2 .

Все эти факты явно противоречат предположению, что только диффузионные ограничения для транспорта кислорода внутрь среза приводят к торможению дыхания при уменьшении pO_2 . Так, при увеличении скорости потребления кислорода можно было бы ожидать лишь увеличения критического pO_2 в противоположность тому, что имеется при внесении в среду инкубации сукцината или НАД-зависимых субстратов. С другой стороны, ослабление дыхания должно было бы сдвигать критическую концентрацию в сторону низких pO_2 , это опять-таки противоположно тому, что имеет место при внесении KCN.

На основании всех этих экспериментов можно сделать вывод, что для срезов печени и мозга зависимость скорости дыхания от парциального давления кислорода связана в первую очередь с особенностями метаболических процессов, идущих в ткани. Следует отдавать отчет, что чрезвычайная опосредованность скорости дыхания как параметра метаболизма затрудняет возможность получения прямого ответа на вопрос о конкретном пути перестройки с помощью измерения только поглощения кислорода. Однако важно то, что зависимость скорости дыхания от pO_2 является показателем, изменения которого связаны в большей степени с изменением метаболизма, нежели с диффузией.

ВЛИЯНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КИСЛОРОДЗАВИСИМЫХ ПУТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ В КЛЕТКЕ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ ДЫХАНИЯ ОТ pO_2

Наличие множественных оксидаз с неодинаковым сродством к кислороду в различных компартментах клетки делает реальным предположение о том, что видимая скорость дыхания может отражать суммарный вклад активностей этих оксидаз в валовое потребление кислорода и, следовательно, зависеть от их количественного соотношения в данном стационарном состоянии. Однако чувствительность к кислороду различных потребляющих O_2 путей может сильно различаться (табл. 5).

Таблица 5. Константы Михаэлиса некоторых кислородзависимых реакций

Реакция	$K_M(O)$, М	Источник
Цитохромоксидаза	$10^{-7}-10^{-6}$	[425]
Гидроксилирование в микросомальной фракции		
N-этилморфина	$4 \cdot 10^{-6}-5 \cdot 10^{-6}$	[222]
гексobarбитала	$4,3 \cdot 10^{-6}$	[316]
алпренолола	$8,7 \cdot 10^{-6}$	[316]
Ферментативное перекисное окисление (микросомальная фракция)	$3 \cdot 10^{-5}$	[382]
Пероксисомы (изолированные)	$10^{-4}-4 \cdot 10^{-4}$	[506]
Уратоксидаза	$10^{-4}-2 \cdot 10^{-4}$	[506]
Тирозингидроксилаза (мозг)	$1,5 \cdot 10^{-3}$	[230]
Триптофангидроксилаза (мозг)	10^{-3}	[324]

Так, например, чувствительность цитохромоксидазы к O_2 на три порядка выше, чем микросомальных или пероксисомальных оксидаз, катализирующих образование H_2O_2 в кислородзависимой реакции. В отдельных случаях это потребление может составлять значительную часть от общего дыхания (см. ниже). Поэтому можно ожидать, что при уменьшении концентрации кислорода в среде активность микросомальных и пероксисомальных оксидаз будет отражаться на виде зависимости V_d/pO_2 . Т. е. можно ожидать, что зависимость скорости дыхания от pO_2 будет определяться преимущественно $K_M(O)$ той реакции, которая в данный момент выступает в качестве главного потребителя кислорода в клетке. Рассмотрим это на конкретных примерах.

Если считать, что основная часть потребляемого клеткой кислорода связана с дыхательной цепью митохондрий, то следовало бы ожидать, что зависимость V_d/pO_2 в условиях *in vitro* (изолированные клетки или тонкие срезы) будет определяться в основном кинетическими характеристиками для цитохромоксидазы, имеющей самые низкие значения $K_M(O)$. Однако в действительности это наблюдается далеко не всегда, что и следует из рис. 3, где была показана как линейная, так и гиперболическая зависимость V_d/pO_2 для срезов печени, появляющаяся в процессе их перерождения.

Таблица 6. Цианидрезистентное дыхание (% к исходному) в срезах печени в различное время после экстирпации

Субстрат	Контроль		После фенобарбитала
	5 мин	60 мин	60 мин
Эндогенный	42	25	39
Сукцинат	17	11	18

Относительным количественным показателем участия альтернативных путей в клеточном дыхании является соотношение цианидчувствительного и цианидрезистентного дыхания (ЦРД) [2, 498], которое зависит от субстрата окисления, типа клеток, метаболического состояния и т. д. (табл. 6).

Так, например, ЦРД свежеизолированных срезов при окислении эндогенных субстратов резко увеличено сравнительно со старыми срезами (через 60 мин после экстирпации). Это может свидетельствовать об относительно меньшей доли митохондриального дыхания в первом случае, нежели в последнем, т. е. о снижении влияния $K_m(O)$ цитохромоксидазной реакции на зависимость V_d/pO_2 . Остаточное дыхание после действия KCN также может складываться из различных составляющих, в том числе из монооксигеназных реакций микросомальной системы окисления, $K_m(O)$ которых мало отличается от соответствующих значений, показанных для цитохромоксидазы. Однако количество кислорода, утилизируемое в монооксигеназных реакциях в отсутствие специфического экзогенного субстрата окисления (например, амидопирина) сравнительно невелико (до 10% от общей величины клеточного дыхания). Поэтому эти реакции не могут давать существенный вклад в O_2 -зависимый процесс в случае свежеизолированных срезов. Следовательно, ответственными за высокое остаточное дыхание в данном примере должны быть другие эндогенные процессы с более высоким $K_m(O)$. В силу этого зависимость V_d/pO_2 в исследованном диапазоне концентраций кислорода может существенно отличаться от гиперболической и приближаться к линейной (см. рис. 4).

Иное показано для срезов и клеточных суспензий печени после преинкубации в течение 60 мин. Относительная чувствительность эндогенного дыхания таких срезов к KCN

увеличивается, что говорит в пользу усиления O_2 -зависимых процессов, связанных с основной дыхательной цепью. Соответственно уменьшается удельный объем немитохондриальных кислородзависимых реакций, в которых монооксигеназные реакции по-прежнему составляют около 10%. На долю остаточного дыхания приходится уже не 32%, а всего 15%. Благодаря изменению соотношения в пользу реакций, имеющих низкую $K_m(O)$, может появиться «изгиб» кривой суммарной зависимости V_d/pO_2 , свидетельствующий об увеличении вклада этих реакций (см. рис. 6).

Особый случай представляет сукцинат, который имеет кинетические преимущества для окисления в области низких значений pO_2 [74]. В его присутствии ЦРД составляет всего 7–17% независимо от сроков переживания срезов, т. е. вклад митохондриального дыхания относительно высок. Так как сукцинат обладает антиоксидантными свойствами [34], он подавляет и свободнорадикальные процессы, связанные с окислением органических перекисей и имеющие низкую $K_m(O)$. Поэтому в присутствии сукцината происходит появление или усиление нелинейности в зависимости V_d/pO_2 (рис. 10).

На основании рассматриваемой гипотезы достаточно просто объяснить изменения этой зависимости в присутствии различных ингибиторов дыхания. Так, KCN, ингибируя цитохромоксидазу, «вырезает» основную составляющую митохондриального дыхания с низкой $K_m(O)$. Остаточное дыхание поддерживается реакциями, имеющими $K_m(O)$ на 1–3 порядка больше. Поэтому происходит переход к более линейной зависимости V_d/pO_2 у старых срезов (рис. 11), либо уменьшение угла наклона в случае, если эта зависимость была линейной.

Амитал, ингибируя поток электронов через дыхательную цепь, поступающий за счет окисления НАД-зависимых субстратов, имеет в этом случае сходное действие с KCN. Однако на фоне сукцината, окисляющего по НАД-независимому пути, амитал не только практически не влияет на форму этой зависимости, но даже увеличивает ее «кривизну». Подавляя сохраняющийся в присутствии сукцината подток восстановительных эквивалентов от эндогенных субстратов, он тем самым обеспечивает более полноценное использование сукцината (см. рис. 10).

Разобшиитель окислительного фосфорилирования—2,4-динитрофенол, наоборот, повышает скорость потребления

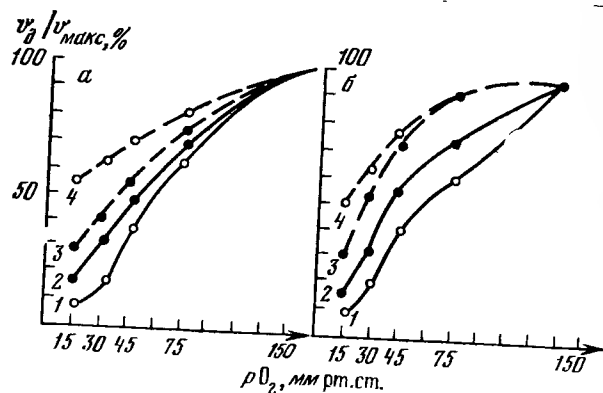


Рис. 10. Зависимость V_d/pO_2 для срезов печени (а) и мозга (б) 1 — глюкоза; 2 — амитал; 3 — сукцинат; 4 — сукцинат+малонат. Время переживания срезов 60 мин

кислорода клетками в 1,7 раза за счет несопряженного транспорта электронов в дыхательной цепи, что и приводит к увеличению нелинейности в зависимости V_d/pO_2 (рис. 12).

Ингибитор цитохрома P-450 SKF-525A не вносит существенных изменений в форму этой зависимости, что еще раз подтверждает связь остаточного дыхания в данном конкретном случае с иными кислородзависимыми процессами, нежели монооксигеназные реакции, имеющими более высокую $K_M(O)$. Поэтому субстрат митохондриального окисления — амидопирин, активирующий эти реакции и увеличивающий тем самым вклад процессов с относительно низкой $K_M(O)$, существенно не меняя общего количества кислорода, потребляемого клетками, приводит к появлению «изгиба» или увеличению нелинейности зависимости V_d/pO_2 на фоне увеличения ЦРД (рис. 13). В присутствии SKF-525A действие амидопирин, как и следовало ожидать, не проявляется (рис. 13). В противоположность этому, активация реакций, имеющих высокие значения $K_M(O)$ (например, ферментативного перекисного окисления), приводит к переходу от гиперболического типа зависимости V_d/pO_2 к линейному (рис. 14).

При индукции ферментов митохондриального окисления (введение животным фенобарбитала) общая скорость дыхания срезов печени мало изменяется по сравнению с кон-

Рис. 11. Зависимость V_d/pO_2 для срезов печени (20 мин) в присутствии KCN ($5 \cdot 10^{-4}$ М)

1 — глюкоза;
2 — глюкоза + KCN

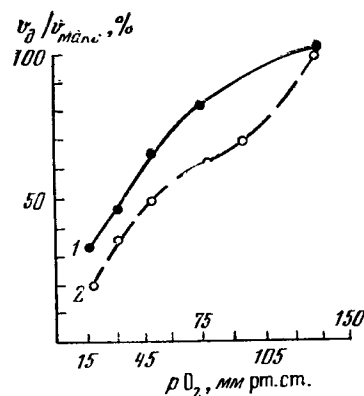


Рис. 12. Зависимость V_d/pO_2 для срезов печени (20 мин) в присутствии ДНФ ($5 \cdot 10^{-5}$ М) (2) и без него (1)

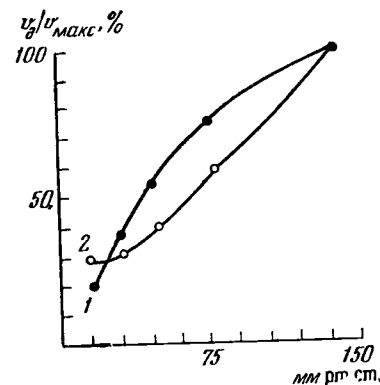
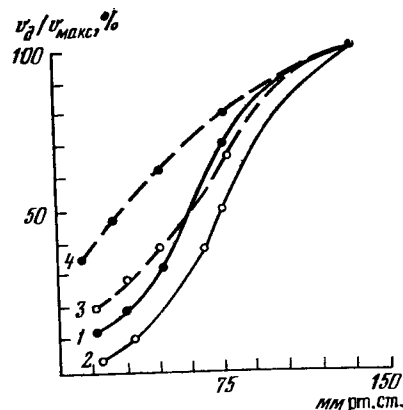


Рис. 13. Зависимость V_d/pO_2 для срезов печени при окислении глюкозы

1 — контроль;
2 — SKF-525A;
3 — SKF-525A + амидопирин;
4 — амидопирин



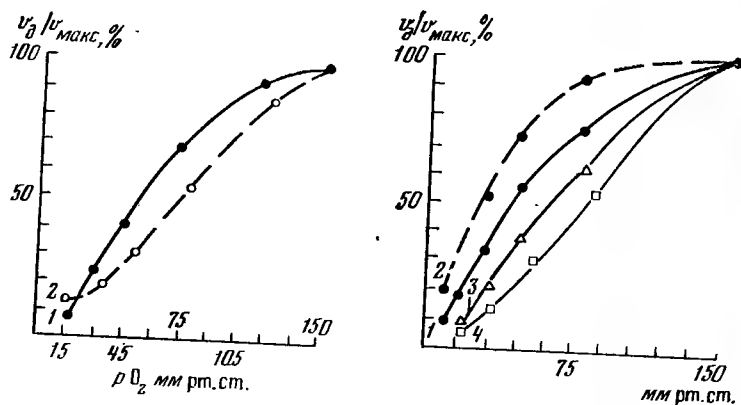


Рис. 14. Зависимость V_d/pO_2 для срезов печени (60 мин)
1 — глюкоза; 2 — $Fe_2SO_4 + АДФ$

Рис. 15. Зависимость V_d/pO_2 для срезов мозга (60 мин)
1 — глюкоза; 2 — сукцинат; 3 — глюкоза + амитал; 4 — глюкоза + KCN

трольными животными. Однако соотношение чувствительного и нечувствительного к KCN дыхания, как было показано, существенно отличается (см. табл. 6). При этом происходит относительное и абсолютное увеличение ЦРД за счет реакций с более высокими значениями $K_M(O)$ и гиперболическая зависимость V_d/pO_2 становится линейной (см. рис. 7). Добавление на этом фоне амидопирин или амитала (в условиях индуцированной системы микросомального окисления последний используется клеткой прежде всего как субстрат монооксигеназных реакций) активирует реакции гидроксилирования. Увеличение удельной активности реакций с более низкой $K_M(O)$. в свою очередь, приводит к появлению нелинейной зависимости V_d/pO_2 .

В ткани мозга, где, как известно, содержание цитохрома Р-450 в 30 раз меньше, чем в печени [486], SKF-525A не влияет на характер этой зависимости. Амидопирин взаимодействует в высоких концентрациях только с НАД-зависимым участком дыхательной цепи и дает поэтому изменения, сходные с амиталом, т. е. приводит к линейной зависимости V_d/pO_2 . Действие же сукцината, ингибиторов митохондриальной дыхательной цепи и активаторов перекисного окисления влияет на характер кривых зави-

симости V_d/pO_2 в срезах мозга, так же как в печени (рис. 15).

Рассмотренные примеры позволяют убедиться в том, что зависимость V_d/pO_2 , а именно большая или меньшая степень выраженности ее нелинейности или, наоборот, линейности, может быть связана и определяться кинетикой кислородзависимых процессов, которые в данном стационарном состоянии в качестве составляющих формируют уровень клеточного дыхания.

Следовательно, наблюдаемая в некоторых случаях линейная зависимость V_d/pO_2 в клетках или срезах отражает не столько диффузионные ограничения, сколько преобладание в этот момент реакций, имеющих относительно низкое сродство к кислороду — высокую $K_M(O)$.

Таким образом, форма этих кривых может быть использована для качественной оценки и прогнозирования соотношения альтернативных кислородзависимых реакций в данном стационарном состоянии при работе с изолированными клетками и срезами. Однако для перфузируемых органов и в условиях *in vivo* такая возможность, по-видимому, отпадает. Это связано прежде всего с тем, что в этих условиях кажущаяся $K_M(O)$ процесса может отличаться от условий *in vitro*.

Важным моментом для проводимого сопоставления является тот факт, что степень восстановленности цитохром-оксидазы в случае изолированных митохондрий намного ниже, чем в интактных клетках или тканях. Это означает, что в равной мере отличается и степень неравновесности цитохромоксидазной реакции. Увеличение скорости цитохромоксидазной реакции благоприятствует смещению регуляторной стадии в область «равновесной» регуляции окислительного фосфорилирования, реализуемой в пунктах сопряжения и определяемой уже доступностью АДФ и неорганического фосфата, а не зависимостью цитохромоксидазы от фосфатного потенциала (см. гл. II). Этот момент в принципе может обусловить отличия регуляторных характеристик дыхания, получаемых для суспензии изолированных митохондрий и интактных клеток. Поэтому несовпадения области критических концентраций кислорода для изолированных митохондрий и срезов можно связать с различиями в дыхательном контроле в условиях интактной клетки и изолированных митохондрий.

По мнению Чанса [155], одной из причин расхождения результатов *in vivo* и *in vitro* может быть величина кислородного градиента в направлении межкапиллярное пространство — клетка, а также наличие этого градиента внутри клетки.

* * *

Рассмотренный материал приводит к выводу о том, что поступление кислорода в клетку с помощью простой и облегченной диффузии является регулируемым процессом. Кислородный гомеостаз клетки обеспечивает поддержание оптимального градиента напряжения кислорода на участке капилляр—клетка, в формировании которого постулируется участие внутриклеточных молекулярных сенсоров кислорода. Имеются три претендента на эту роль: сенсорная система для кислорода, локализованная в стенках артериол, белковые рецепторы в клеточной мембране и ферменты внутриклеточных кислородзависимых метаболических систем. Ведущее место среди них отводится цитохромоксидазе.

Изучение особенностей зависимости скорости дыхания от pO_2 в модельных системах (тканевые срезы) позволило установить, что форма и толщина срезов не влияют на зависимость V_d/pO_2 . Ее линейность или нелинейность зависят от особенностей метаболизма в данном конкретном состоянии. Именно они определяют реакцию клетки на снижение pO_2 в окружающей среде. В качестве регуляторов этой зависимости выступает не только цитохромоксидаза, но и другие оксидазы. Таким образом, конечный этап поступления кислорода в клетку тесно связан с его окислительным метаболизмом и тем самым с клеточным дыханием.

2. РЕГУЛЯЦИЯ ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ В КЛЕТКЕ

Основным потребителем кислорода в клетке является дыхательная цепь митохондрий. Структура и свойства изолированных митохондрий в настоящее время достаточно хорошо изучены и описаны в ряде фундаментальных монографий и обзоров [68, 70, 72, 409, 410, 467]. Согласно современным представлениям, митохондрии являются субклеточными образованиями, в мембранах которых локализована полиферментная система — так называемая дыхательная цепь, — катализирующая перенос электронов от субстратов к кислороду. Благодаря этому происходит окисление соответствующих субстратов до CO_2 и H_2O . Этот процесс является главным источником энергии для большинства аэробов. В результате окислительных процессов в митохондриях происходят эффективное высвобождение и накопление энергии в форме, пригодной для ее использования в эндогенных реакциях (биосинтезы, процессы активного транспорта, электрогенная функция, механические процессы, люминесценция живых организмов и т. д.).

Получению, накоплению и использованию энергии предшествует сложный многоэтапный путь превращения питательных веществ в организме в формы, которые могут быть утилизированы в клетке в качестве источника энергии и пластического материала.

В результате первого этапа, реализующегося в пищеварительной системе, поступающие в организм углеводы, жиры и белки предварительно расщепляются и превращаются в сахара, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, глицерин и аминокислоты. При этом освобождается незначительное количество энергии (0,6—1%), рассеивающейся в виде тепла.

Второй этап осуществляется в цитозоле и отчасти в митохондриях и связан с высвобождением около 10% энергии. Трансформация веществ, происходящая на втором этапе, связана с работой ряда метаболических систем, таких, как гликолиз, пентозофосфатный цикл, система азотистого обмена (дезаминирование и переаминирование),

система окисления жирных кислот (β -окисление). Число продуктов окисления, образующихся на втором этапе, постепенно уменьшается до ацетил-КоА, сукцинил-КоА, α -кетоглутаровой, пивалевоуксусной и фумаровой кислот, участвующих далее в окислительных процессах цикла Кребса (цикла трикарбоновых кислот — ЦТК).

Третий этап является заключительной стадией окисления питательных веществ, во время которой выделяется до 60—70% всей освобождаемой энергии исходных продуктов. Он реализуется в митохондриях через ЦТК и митохондриальную дыхательную цепь. Окислительные реакции ЦТК протекают без участия кислорода. Последний вступает в реакции только на заключительных стадиях, осуществляемых цепью переноса электронов в митохондриях. Тем не менее ЦТК занимает особое положение во всех системах метаболических превращений, так как практически любое вещество может окислиться до CO_2 и H_2O , если оно превратилось в одно из соединений этого цикла.

Путь обменных превращений в дыхательной цепи митохондрий включает два самостоятельных, хотя и тесно сопряженных процесса: 1) перенос электронов к молекулам коферментов, приводящий к их восстановлению; 2) последующее реокисление восстановленных коферментов путем переноса электронов к кислороду, связанного с синтезом АТФ. Имеется два основных участка поступления восстановленных эквивалентов в дыхательную цепь от субстратов: НАД- и ФАД-зависимый.

В первом случае перенос водорода осуществляет кофермент никотинамидадениннуклеотид НАД, а именно его пиридиновое кольцо. НАД^+ восстанавливается, присоединяя один электрон и один атом Н:



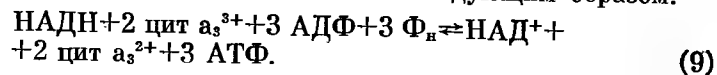
Начальным компонентом этого пути является фермент НАДН-дегидрогеназа, имеющий в качестве простетической группы рибофлавинсодержащий флавиномононуклеотид (ФМН), а также белки, включающие серу и железо. Фермент катализирует перенос водорода с НАДН на ФМН.

Второй путь поступления восстановленных эквивалентов в дыхательную цепь связан с окислением сукцината. Перенос водорода от субстрата катализируется ферментом сукцинатдегидрогеназой, простетической группой которой являются железо- и серосодержащий ферменты.

Восстановительные эквиваленты, поступающие по этим двум путям, способны восстановить все остальные компоненты дыхательной цепи, включая убихинон (коэнзим Q) и цитохромы. Из всех переносчиков электронов, участвующих в дыхательном метаболизме, только цитохром a, a_3 способен непосредственно переносить электроны на кислород. Поэтому электроны, получаемые при окислении самых различных органических молекул в клетке и используемые для получения энергии, в митохондриях должны пройти через это звено.

Общая схема последовательности расположения переносчиков водорода и электронов в дыхательной цепи считается установленной [42] и подтверждается на основании изучения окислительно-восстановительных потенциалов дыхательных переносчиков, определения степени их восстановленности в различных состояниях и скорости окисления путем исследования действия ингибиторов дыхания. Она предсказывается также на основе термодинамических данных, показывающих возможность спонтанного переноса электронов через такую цепь. Известно, что чем ниже окислительно-восстановительный потенциал переносчика электронов и водорода, тем в большей степени он является восстановителем и тем ближе расположен к окисляемому субстрату. Чем выше потенциал системы, тем сильнее выражены ее окислительные свойства. Соединение может отдавать свой водород или свои электроны только такому соединению, которое обладает более высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Непосредственное окисление субстрата осуществляет фермент, у которого переносчик водорода имеет значение окислительно-восстановительного потенциала, близкое к субстрату. Эти соображения определяют порядок ферментов и коферментов в дыхательной цепи. Благодаря этому переход водорода от субстрата к кислороду окружающей среды идет по следующей цепи: НАД-содержащая дегидрогеназа, ФАД-или ФМН-содержащий флавопротеид, убихинон. Восстановленный убихинон освобождает $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. Два электрона восстанавливают 2Fe^{3+} цитохрома в 2Fe^{2+} и передаются далее вдоль цепи цитохромов. 2H^+ , с одной стороны, восстанавливают $\frac{1}{2}\text{O}_2$ до H_2O , с другой — окисляют последний цитохром цепи. Таким образом, перенос двух восстановительных эквивалентов от редокс-пары пиридиннуклеотидов по градиенту электрохимического потенциала

к цитохрому a_3 сопряжен с синтезом 3 молей АТФ. Эти отношения могут быть записаны следующим образом:



Энергия, освобождающаяся при переносе электронов в последовательных стадиях процесса, прямо связана с разностью окислительно-восстановительных потенциалов между двумя переносчиками. Зависимость между окислительно-восстановительным потенциалом и изменениями свободной энергии выражается уравнением Гиббса:

$$\Delta G = -nF\Delta E, \quad (10)$$

где ΔG — изменения свободной энергии для данного пути переноса электронов; n — число электронов; F — число Фарадея (23 040 кал/В); ΔE — разность потенциалов между двумя переносчиками электронов.

Теоретически величина энергии, необходимой для синтеза 1 М АТФ, равна 7,3 ккал/моль, что соответствует для двухэлектронной реакции изменению окислительно-восстановительного потенциала примерно на 0,16 В. В интактной клетке эта величина может достигать 12–15 ккал/моль и более [209, 605]. В дыхательной цепи имеется всего три участка, способных обеспечить достаточное количество энергии для синтеза АТФ. Это участки: НАДН — ФМН; ($\Delta G^\circ = -12,4$ ккал/моль); цитохром b — цитохром c_1 ; ($\Delta G^\circ = -9,2$ ккал/моль); цитохром a , a_3 — O_2 ($\Delta G^\circ = -24,8$ ккал/моль). В каждом из них образуется одна молекула АТФ из АДФ и фосфата.

Таким образом, окисление НАДН дает возможность образовываться трем макроэргическим связям. Окисление ФАДН позволяет образовываться двум макроэргическим связям, а окисление двух ионов Fe^{2+} на участке цитохром c — a , a_3 обеспечивает синтез одной такой связи.

У эукариотов все реакции, включающиеся в транспорт электронов и окислительное фосфорилирование, локализованы в митохондриях: энзимы цикла Кребса находятся в растворимой части матрикса, а белки, энзимы и переносчики электронов транспортной системы (кроме НАД $^+$) — во внутренней мембране митохондрий, образующей выпячивания в виде крист, увеличивающих площадь, занимаемую транспортной системой.

Аэробный ресинтез АТФ из АДФ и фосфата в дыхательной цепи митохондрий является заключительным этапом

дыхательного метаболизма, а окислительные превращения в двух подсистемах энергетического обмена, — по существу, подготовительные процессы.

Итак, электронтранспортная функция дыхательной цепи митохондрий, сопровождающаяся потреблением кислорода, сопряжена с реакциями фосфорилирования. Поэтому особую физиологическую значимость приобретает регуляция этого процесса, главной конечной целью которой является согласование энергообразующего процесса с функцией. Это достигается за счет совокупности механизмов координации окислительных процессов в клетке, которые обеспечивают устойчивость процесса синтеза АТФ при различных воздействиях на нее или изменении внешних условий.

Наличие гомеостатической регуляции АТФ в клетке предполагает зависимость суммарной скорости производства АТФ от интенсивности АТФ-зависимых процессов.

Взаимосвязь процессов образования и использования энергии имеет огромное биологическое значение. Благодаря этому отпадает необходимость непосредственного взаимодействия между реакциями, дающими энергию, и функциями клетки, и в конечном итоге они могут быть разобщены как во времени, так и в пространстве. В результате создается общий энергетический фонд, который перераспределяется в зависимости от потребностей клетки, ее функционального состояния и условий ее взаимодействия с внеклеточной средой.

ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ

Гомеостатическая регуляция дыхания в аэробных клетках, связанная с производством АТФ, предполагает наличие соответствующих механизмов контроля скорости окислительных превращений в митохондриях. Благодаря исследованиям Энгельгарда [78] стало известно, что количественная связь между потреблением кислорода и синтезом АТФ может быть охарактеризована отношением Р/О, указывающим число атомов неорганического фосфора, включающихся в АТФ на каждую половину использованной молекулы кислорода. Процесс протекает только в присутствии акцептора фосфата АДФ. Таким образом, фосфатакцепторный контроль дыхания является важным критерием полноценности дыхания митохондрий.

Допуская, что концентрация неорганического фосфата в живой системе относительно постоянна, Ларди, а также Чанс и Вильямс [139, 155, 163, 164—166, 352] постулировали, что скорость дыхания контролируется и регулируется концентрацией митохондриальной АДФ. Эти представления легли в основу понятия о «кинетическом» контроле дыхания для прочносопряженных митохондрий и по существу являются первой кинетической моделью процесса окислительного фосфорилирования. Согласно Чансу, изолированные митохондрии в отличие от большинства химических систем способны поддерживать устойчивые режимы активности, свидетельствующие о еохранении регуляторных биоэнергетических механизмов на этом уровне. Они были названы им «метаболическими состояниями». Приведение митохондрий в то или иное состояние, по Чансу, зависит от наличия трех основных факторов: 1) субстратов окисления; 2) акцептора фосфата и 3) кислорода. Взаимодействие всех этих составляющих приводит к проявлению нескольких возможных стационарных состояний, описываемых характерными изменениями скоростей потребления кислорода и спектрофотометрически по соотношению окисленно-восстановленных форм дыхательных переносчиков [147, 183—184].

Состояние 1. Митохондрии лишены экзогенных субстратов окисления и акцепторов фосфата. При этом дыхание и фосфорилирование отсутствуют. Дыхательные переносчики максимально окислены.

Состояние 2. В системе имеются субстраты окисления и нет акцептора фосфата. Скорость дыхания мала. Фосфорилирование отсутствует. При достаточно высоких концентрациях субстратов окисления все дыхательные переносчики в значительной степени восстановлены.

Состояние 3. «Активное». Митохондрии обеспечены и субстратами окисления, и акцептором фосфата (АДФ). Происходит резкая стимуляция дыхания, которая в этих условиях сопровождается фосфорилированием. Происходит увеличение концентрации окисленных форм пиридиннуклеотидов (НАД), флавопротеидов и цитохромов (а, а₃, с₁, с, в) и соответствующее уменьшение концентрации их восстановленных форм. Степень восстановленности переносчиков уменьшается по сравнению с состоянием 2.

Состояние 4. «Контролируемое», или «отрегулированное». В системе происходит истощение добавляемого акцептора фосфата. Концентрация субстратов окисления

продолжает оставаться высокой, скорость поглощения кислорода резко падает по сравнению с состоянием 3. Степень восстановленности переносчиков снова возрастает.

Состояние 5. Митохондрии находятся в условиях избытка субстрата окисления и акцептора фосфата. Однако в противоположность первым четырем состояниям в среде инкубации отсутствует кислород. Перенос электронов по цепи дыхательных переносчиков не происходит, так же как и процесс фосфорилирования. Степень восстановленности переносчиков максимальна. Состояние 5 реализуется также в случае блокирования цитохромоксидазы, когда содержание кислорода достаточно высоко, но перенос на него электронов из дыхательной цепи отсутствует.

Таким образом, согласно схеме Чанса, область «динамического» контроля (активация дыхания в присутствии экзогенной АДФ в стационарном состоянии 3) позволяет получать кинетические характеристики процесса окислительного фосфорилирования: его скорость (АДФ/ t , где t — время фосфорилирования), а также стехиометрию процесса и его эффективность (АДФ/О). Относительным показателем его интенсивности и одновременно степени сопряженности является индекс дыхательного контроля, или, просто, дыхательный контроль [163—166]. Он выражается в виде отношения скоростей дыхания в состоянии 3 и 4 и характеризует различия в потреблении кислорода во время активного фосфорилирования и после его завершения. При переходе от 3-го к 4-му состоянию оптические методы регистрируются окислительно-восстановительные изменения основных компонентов дыхательной цепи [147, 166, 167].

Работы Чанса сыграли огромную роль в биоэнергетике, составив на определенном этапе ее методическую основу. Кинетический контроль дыхания широко используется до сих пор для оценки степени энергизации препарата в условиях *in vitro* в присутствии избытка субстратов и стационарной концентрации кислорода. Считается, что более высокие значения дыхательного контроля свидетельствуют о лучшей сопряженности процессов окисления и фосфорилирования.

Самостоятельным развитием этого направления являются исследования М. Н. Кондрашовой [32—36], в которых кинетический контроль дыхания и другие параметры окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий используются для оценки свойств и реактивности тка-

ней в разных функциональных состояниях. Любые внешние воздействия на организм, меняющие его функциональное состояние, тем самым влияют на поведение митохондрий и на состояние дыхательной цепи последних и их метаболические характеристики, которые могут быть выявлены в условиях эксперимента *in vitro*. Они выражаются также в небольших количественных изменениях различных параметров окислительного фосфорилирования и в совокупности позволяют очень тонко дифференцировать степень энергизации препарата. Так, появилось понятие о «грациях метаболических состояний», проявление которых в изолированных митохондриях указывает на сохранение в последних механизмов, ответственных за обеспечение стационарного режима физиологической деятельности, характерных для неповрежденных органов и тканей.

«Грация метаболических состояний» и «биохимический цикл» возбуждения (по Кондрашовой) — это удачная попытка применения ДК и других параметров дыхания и окислительного фосфорилирования для классификации переменного-сопряженных состояний изолированных митохондрий; это биохимическая модель регуляции энергетического обмена при возбуждении и торможении, в норме и при патологии, с учетом возможности переключения метаболических путей по ходу деятельности. Особая ценность такого подхода — в использовании параметров энергетического обмена, полученных *in vitro*, в качестве диагностических критериев физиологического состояния клетки *in vivo*.

Однако использование дыхательного контроля для исследования механизма окислительного фосфорилирования имеет и серьезные ограничения. Действительно, измерение дыхательного контроля далеко не всегда отражает изменения энергопродукции митохондрий. Известны случаи, когда при снижении дыхательного контроля скорость окислительного фосфорилирования повышена и, наоборот, при высоких концентрациях она снижена. Наконец, равным значениям дыхательного контроля при исходно равных концентрациях АДФ может соответствовать разный объем окислительных превращений [34, 36]. Это связано прежде всего с тем, что не АДФ регулирует скорость дыхания, а потребность клетки в энергии.

Имеются и методические причины, ограничивающие в ряде случаев информативность дыхательного контроля. По мере того как совершенствовалась техника получения изолированных митохондрий, удавалось регистрировать все

более высокие значения дыхательного контроля. Оказалось возможным получить на изолированных митохондриях из самых различных тканей (миокарда, скелетной мышцы, мозга, почки) величину дыхательного контроля более 25 [596]. Было показано, например, что, когда летательная мышца насекомого переходит из активного состояния в состояние покоя, дыхание увеличивается в 1000 раз. Все это наводило на мысль о том, что состояние дыхания 4 изолированных митохондрий является артефактом эксперимента.

Наряду с этим накапливались факты, свидетельствующие об обратимости реакций окислительного фосфорилирования. Чанс [150] и Клингенберг [335, 337, 338] показали, что редокс-реакции между редокс-парами пиридинуклеотидов и цитохрома с могут обращаться в присутствии АТФ. Следовательно, между последними и аденинуклеотидной системой существует равновесие. Эти представления явились отправным моментом для создания модели термодинамического контроля дыхания, основы которой были заложены независимо друг от друга Клингенбергом и Слейтером.

Слейтер [515] предположил, что в состоянии 4 низкая скорость дыхания зависит от соотношения окисленных и восстановленных форм переносчиков, находящихся в состоянии, близком к равновесному, а также от логарифма отношения $[АТФ]/[АДФ][Ф_n]$, т. е. речь идет уже не о кинетическом контроле дыхания, а о термодинамическом, когда скорость дыхания регулируется отношением действующих масс:



Согласно Клингенбергу, в прочно сопряженных митохондриях скорость дыхания находится под термодинамическим контролем не только в состоянии 4, но и в активном состоянии 3 [335, 337, 338]. Им было экспериментально показано, что степень восстановления митохондриального цитохрома с является функцией не концентраций, а отношения $[АТФ]/[АДФ][Ф_n]$, что предполагает обратимость процесса окислительного фосфорилирования [335, 337, 338].

Обратимость процессов окислительного фосфорилирования предполагает наличие практического равновесия в дыхательной цепи, что невозможно с точки зрения гипотезы кинетического контроля дыхания и требует согласования этого представления с известным положением о том,

что живые организмы суть неравновесные системы с точки зрения термодинамики. Для поддержания их жизнедеятельности необходим непрерывный направленный поток субстратов через метаболические пути для превращения их в структурные элементы и энергию.

Работами Кребса [345, 517] и Бюхера [120] установлено, что метаболические пути в клетке содержат много ферментативных звеньев, в основе которых лежат практически равновесные реакции. Неравновесность же всей системы в целом задается свойствами лишь некоторых необратимых по существу реакций, которые и выполняют роль кинетического контроля всего потока метаболитов через весь путь и являются, таким образом, потенциальными пунктами регулирования стационарного режима. По мнению Кребса [345], факт, что термодинамическое равновесие клетки является синонимом смерти, не подразумевает, что равновесие не может играть важную роль в организации химической динамики клетки. Равновесие образует фон, на который накладываются фактически необратимые процессы.

Поскольку окислительное фосфорилирование включает два принципиально различных типа реакций, а именно окислительно-восстановительные превращения и реакции фосфорилирования АДФ, обоснование существования «термодинамического контроля дыхания» в этой системе требовало рассмотрения организации работы дыхательной цепи с позиций равновесной термодинамики, которые включают три момента: 1) определение термодинамических констант участников системы транспорта электронов в дыхательной цепи; 2) анализ соотношений величины свободной энергии различных окислительно-восстановительных этапов и реакций фосфорилирования АДФ; 3) установление неравновесных реакций в системе общего равновесия.

Огромная заслуга в развитии этих исследований принадлежит Уилсону, Еречинской и другим исследователям [209, 211, 214, 446, 593, 597, 602, 604, 605]. С помощью новой и более совершенной техники они измерили и уточнили величины стандартных окислительно-восстановительных потенциалов отдельных переносчиков дыхательной цепи как на изолированных ферментных комплексах, так и (впервые) на изолированных митохондриях. Благодаря этим исследованиям в настоящее время окончательно утвердилось представление о том, что дыхательные переносчики объединяются в четыре изопотенциальные группы. Восстановительные эквиваленты от НАДН

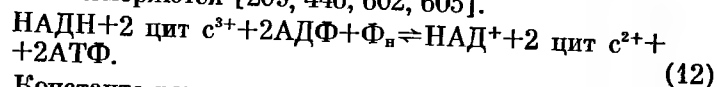
передаются группе компонентов с потенциалами полувосстановления около $-0,3$ В. Затем при участии специфического механизма, включающего железосерные центры, восстановительные эквиваленты передаются в группу с потенциалом, близким к 0. Далее идет обмен с группой, объединенной значениями потенциала около $+0,24$ В, через механизм, предполагающий участие цитохромов b , и c . Группа с наиболее положительным потенциалом около $+0,4$ В включает только цитохром a_3 и медьсодержащий белок. Цитохром a_3 , кроме того, ответствен за восстановление молекулярного кислорода.

Компоненты, относящиеся к одной изопотенциальной группе, имеют близкие величины стандартных потенциалов. По ним, а также по данным спектральных измерений степени восстановленности переносчиков могут быть вычислены значения окислительно-восстановительных потенциалов различных компонентов системы транспорта электронов в дышащих митохондриях. Расчеты показали, что они также приблизительно равны. Поэтому перенос восстановительных эквивалентов между ними должен происходить при изменениях свободной энергии, близких к нулю, благодаря чему соответствующие реакции обмена должны быть практически равновесными. Действительно, экспериментально удалось показать, что общая скорость обмена восстановительными эквивалентами внутри каждой изопотенциальной группы в 1000 раз больше, чем скорость переноса между изопотенциальными группами [150, 593—597]. Таким образом, изопотенциальные группы представляют собой один из равновесных этапов переноса электронов в дыхательной цепи.

Другой тип равновесных отношений проявляется в процессе сопряжения окисления и фосфорилирования. Этот процесс включает два типа реакций: перенос электронов и синтез АТФ. Первый осуществляется на участке редокс-пара НАДН/НАД⁺ — молекулярный кислород за счет разности окислительно-восстановительных потенциалов, возникающих между изопотенциальными группами. В соответствии с уравнением Гиббса этот процесс должен сопровождаться изменением свободной энергии. Однако синтез АТФ не может происходить спонтанно, без связи с другой энергообразующей реакцией. С позиций равновесной термодинамики потеря свободной энергии любой парой электронов на пути от НАДН к цитохрому a_3 должна количественно восстанавливаться в фосфорилировании трех

молекул АДФ, приводящему к синтезу трёх молекул АТФ (уравнение 12). Из уравнения следует, что все три пункта фосфорилирования имеют общие интермедиаты и должны иметь равные изменения свободной энергии (равновесная модель окислительного фосфорилирования) [209, 597]. Действительно, оказалось, что разность потенциалов между редокс-парами НАДН и цитохром a_3 , $\Delta E = 0,960$ В. Это значит, что при переносе двух электронов через три пункта фосфорилирования свободная энергия переноса $\Delta G = 45$ ккал (15 ккал на пункт фосфорилирования) [593]. Свободная энергия гидролиза АТФ $\Delta G_{\text{АТФ}}$ была равна 15–16 ккал/моль [209].

Практически при изучении зависимости между переносом восстановительных эквивалентов и синтезом АТФ пользуются уравнением, описывающим взаимодействие между изопотенциальными группами I и III, так как термодинамические параметры цитохрома с хорошо известны и легко измеряются [209, 446, 602, 605].



Константа равновесия этого уравнения может быть определена в экспериментальных условиях:

$$K = \frac{[\text{НАД}^+][\text{цит } c^{2+}]^2}{[\text{НАДН}][\text{цит } c^{3+}]^2} \frac{[\text{АТФ}]^2}{[\text{АДФ}]^2 [\Phi_n]^2}. \quad (13)$$

Именно для такой системы Чанс и Клингенберг показали обратимость потока электронов [150, 335, 338]. Уилсон и Еречинской [209, 597] также было экспериментально продемонстрировано, что разность окислительно-восстановительных потенциалов между изопотенциальными группами является линейной функцией логарифма отношений $[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}][\Phi_n]$. Потеря свободной энергии при переносе 2 моль/эквивалентов от пары $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ к переносчикам третьей изопотенциальной группы равна энергии, аккумулированной при синтезе 2 молей АТФ из АДФ и Φ_n [209] (см. ниже табл. 8). Таким образом, между пулом митохондриальных пиридиннуклеотидов, снабжающих дыхательную цепь восстановительными эквивалентами, переносчиками электронов дыхательной цепи и пулом АТФ—АДФ— Φ_n существует равновесие, описываемое уравнением (13). Свободная энергия переноса восстановительных эквивалентов между ними равна свободной энергии фосфорилирования в пунктах сопряжения (либо гидролиза АТФ), происходящего в ответ на изменение отношения

$[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}][\Phi_n]$ [209, 212, 291, 448, 594, 602, 603]. Эта зависимость сохраняется в очень широком диапазоне изменений последнего.

В уравнении (13) первые два члена представляют собой значения концентраций окисленных и восстановленных форм митохондриальной пары коэнзимов НАД^+ и НАДН и цитохрома с соответственно. Третий член — отношение $[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}][\Phi_n]$, характеризующее «фосфорилирующее» состояние немитохондриального пула свободных адениннуклеотидов¹ [209, 446, 597, 603] и обусловленное тем, что в клетке энергетические траты связаны в основном с немитохондриальным пулом АТФ. Следовательно, митохондриальная дыхательная цепь должна быть приспособлена к тому, чтобы реагировать на энергетические запросы, поступающие извне [209]. Поэтому следует ожидать, что и в суспензии изолированных митохондрий добавление соответствующих концентраций АТФ, АДФ и Φ_n в инкубационную среду будет регулировать дыхание. Проверка этого положения показала, что увеличение концентрации АТФ (в митохондриях сердца, например, от 1 до 8 мМ) приводит к уменьшению дыхательного контроля вместе с увеличением скорости дыхания, т. е. увеличении области «динамического контроля» [291, 446, 603].

Специальному обсуждению подлежит вопрос о роли неорганического фосфора в этом процессе. Следует отметить, что в большинстве исследований с изолированными митохондриями его экзогенная концентрация менялась не более, чем в 2 раза. В таких условиях влияние Φ_n на дыхание не могло существенно проявляться. Это привело к тому, что Клингенберг считал возможным в условиях стационарной концентрации Φ_n рассматривать в качестве регулятора клеточного дыхания отношение $[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}]$, которое включает АТФазную реакцию и реакцию обмена в аденилатном пуле [336]. Слейтер же в более поздних своих работах постулировал зависимость скорости дыхания только от отношения $[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}]$ [515]. Тем не менее Уилсон и соавторы [291, 446, 594] показали, что Φ_n является необходимым компонентом процесса окислительного фосфорилирования и участвует в регулировании дыхания. Влияние различных концентраций Φ_n на дыхание обратно

¹ Следует отличать «фосфорилирующее» состояние немитохондриального пула адениннуклеотидов от «фосфатного потенциала», который описывается следующим выражением [446]:

$$E_p = \Delta G'_0 [\text{АТФ}]/2F + (RT/2F) \ln ([\text{АТФ}]/[\text{АДФ}][\Phi_n]). \quad (14)$$

тому, что имеет место для АТФ. Чем больше концентрация Φ_n , тем выше дыхательный контроль в состоянии 3 и меньше область «динамического контроля» (по Чансу). Таким образом, в прочно сопряженных митохондриях (мозга, почек, печени, сердца) потребление кислорода зависит не от отношения $[АТФ]/[АДФ]$, а от внемитохондриального отношения $[АТФ]/[АДФ]$ $[\Phi_n]$.

Согласно уравнению (13), дыхание определяется двумя независимыми переменными. Величина первой из них (значение отношения $[НАД^+]/[НАДН]$ зависит от поступления восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь, т. е. от работы ЦТК. Величина второй (отношение $[АТФ]/[АДФ]$ $[\Phi_n]$ цитозольного пула) определяется скоростью утилизации АТФ в клетке. Изменения обеих переменных связаны друг с другом через отношения в первом и втором пунктах фосфорилирования. Следовательно, при постоянных значениях $[АТФ]/[АДФ]$ $[\Phi_n]$ скорость митохондриального дыхания должна зависеть от внутримитохондриального отношения $[НАД^+]/[НАДН]$. Но так как на участке НАД—цитохром с поддерживается равновесие, то практически можно говорить о зависимости дыхания от восстановленности цитохрома с. Это демонстрируется как на суспензии изолированных митохондрий [597], так и на различных клетках [206], где прямо показано, что скорость дыхания есть функция редокс-состояния цитохрома с в широком пределе значений его восстановленности.

И наоборот, при постоянном отношении $[НАД^+]/[НАДН]$ (цит c^{3+} /цит c^{2+}) можно наблюдать влияние отношения $[АТФ]/[АДФ]$ $[\Phi_n]$ на скорость дыхания. При этом подразумевается, что речь идет о цитозольном пуле адениннуклеотидов и Φ_n , так как он не только существенно больше митохондриального, но и прямо связан с экзергоническими процессами [191, 203, 268, 563]. Таким образом, анализ соотношения величины свободной энергии различных окислительно-восстановительных этапов и реакций фосфорилирования АДФ позволил установить зависимость скорости дыхания не от концентрации отдельных реагентов, а от состояния фосфорилирования адениннуклеотидной системы в целом и окислительно-восстановительного состояния пары НАД (или цитохрома с).

Однако если окислительно-восстановительные реакции дыхательной цепи митохондрий находятся в практическом равновесии с реакциями фосфорилирования, то и все промежуточные стадии должны находиться в равновесии, что

исключает существование внутри этой части дыхательной цепи этапа, контролирующего общий поток восстановительных эквивалентов. Следовательно, дыхательный контроль должен осуществляться либо на субстратном конце дыхательной цепи, либо в реакции между цитохромом a_3 и кислородом. Единственной неравновесной реакцией, обладающей достаточно большой величиной свободной энергии в условиях высоких значений отношения $[АТФ]/[АДФ]$ $[\Phi_n]$ (прочно сопряженные митохондрии), является восстановление кислорода цитохромом a_3 . Именно это делает его потенциальным объектом регулирования через изменение редокс-состояния предшествующего переносчика. Измерение потенциалов полувосстановления в пунктах сопряжения в присутствии АТФ с помощью потенциометрического метода титрования суспензии несопряженных митохондрий действительно показало, что цитохром a_3 значительно сильнее реагирует на изменение отношения $[АТФ]/[АДФ]$ $[\Phi_n]$ сравнительно с другими цитохромами, в то время как цитохром a отвечает лишь на изменения цитохрома a_3 [291]. Эти факты делают цитохром a_3 наиболее вероятным претендентом на роль регуляторной стадии в процессе синтеза АТФ, когда концентрация O_2 не лимитирует транспорт электронов в дыхательной цепи.

Таким образом, в суспензиях митохондрий *in vitro* скорость дыхания зависит от уровня восстановленности дыхательных переносчиков и от фосфорилирующего состояния адениннуклеотидной системы. Уменьшение степени фосфорилирования АДФ снижает разность окислительно-восстановительных потенциалов в каждом из пунктов преобразования энергии. Общая разность потенциалов между редокс-парами НАД⁺/НАДН и цитохрома a_3 уменьшается, что может происходить только в результате восстановления последнего и окисления НАДН. Этот процесс и осуществляет контроль дыхания. Отсюда следует, что взаимосвязь уровня восстановленности дыхательных переносчиков и отношение $[АТФ]/[АДФ]$ $[\Phi_n]$ играют главную роль в контроле клеточного дыхания.

СОСТОЯНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В КЛЕТКАХ

Несмотря на обширный экспериментальный материал и теоретические данные, накопленные в работе с изолированными митохондриями и касающиеся особенностей регуляции работы дыхательной цепи, вопрос о специфиче-

ских особенностях ее поведения в интактной клетке в условиях сохранения сложнейшей связи между отдельными внутриклеточными структурами и метаболическими процессами, протекающими в них, до сих пор не снят с повестки дня.

В наиболее ранних работах неоднократно делались попытки проведения аналогий между состоянием дыхательной цепи митохондрий *in vitro* и в интактных клеточных либо даже органных системах (мышца, печень, сердце, асцитные клетки, нервная ткань). Такого рода исследования привели к выводу о том, что потенциальная окислительная способность клеточных препаратов соответствует тому, что известно для изолированных митохондрий [136, 139—141, 144, 146—149, 151, 167, 266, 275, 398, 426, 586].

Эффективность окислительного фосфорилирования в клеточных препаратах также оценивается теми же параметрами, что и в изолированных митохондриях. Следует напомнить, что открытие сопряжения окисления и фосфорилирования было сделано на клетках и гомогенатах [78]. В более поздний период Чансом были получены значения P/O для интактных клеток асцитной опухоли Эрлиха, равные 0,9 на пункт фосфорилирования, что соответствует лучшим значениям, известным для изолированных митохондрий [146—149, 275]. Образование 1 моля АТФ на пункт фосфорилирования было подтверждено в серии исследований последних лет на самых разных клеточных объектах, органах и тканях: изолированных клетках печени, перфузируемых печени и сердце, у простейших одноклеточных, представителей разных классов [206, 214, 332, 406, 426, 603, 604].

Прижизненные кинетические исследования работы дыхательной цепи в интактных клетках появились в 50-х годах благодаря внедрению в экспериментальную биохимию полярографического метода регистрации дыхания, а также прижизненных спектральных методов. С их помощью удалось установить, что в интактной клетке сохраняется общая закономерность расположения дыхательных переносчиков, сравнительно с изолированными митохондриями [146, 164—166, 615], т. е. в условиях *in vitro* и *in vivo* сохраняются общие принципы структурной организации дыхательной цепи.

Совокупность всех этих данных, полученных уже к началу 60-х годов, сделала оправданной попытку исследователей использовать методические приемы, успешно разви-

ваемые применительно к изолированным митохондриям, для оценки состояния дыхательной цепи и изучения вопросов регуляции тканевого дыхания в интактной клетке.

Так, была рассмотрена возможность проявления кинетического контроля дыхания по Чансу. При этом следует сразу же оговорить принципиальные и очевидные отличия, касающиеся стационарных метаболических состояний в условиях *in vitro* и *in vivo*. Состояния 1 и 2, по Чансу, в последнем случае, по-видимому, могут наблюдаться очень редко, потому что в клетке, как правило, имеется избыток эндогенных субстратов, АДФ и F_n . Наиболее подходящими для аналогий являются состояния 3 и 4. Покоящаяся ткань, когда почти вся эндогенная АДФ фосфорилирована в АТФ, более всего приближается к метаболическому состоянию 4. Усиление в клетке процессов, потребляющих АТФ, должно приводить к образованию эндогенной АДФ, активации в связи с этим транспорта электронов в дыхательной цепи и сопряженного увеличения потребления кислорода (состояние 3). Рефосфорилирование АДФ до АТФ вновь приведет к торможению дыхания (возвращение к исходному состоянию 4). По аналогии с изолированными митохондриями в этом случае переход от состояния 3 к состоянию 4, сопровождающийся соответствующими редокс-изменениями дыхательных переносчиков, можно использовать в качестве кинетического контроля дыхания. Но именно в силу этого получение дыхательного контроля в интактной клетке в присутствии экзогенной АДФ, как это принято для изолированных митохондрий, может быть сопряжено с определенными трудностями. Они вытекают прежде всего из того, что, как было показано в предыдущем разделе, синтез и расход энергии в ней практически неразделимы и протекают одновременно. Поэтому образующаяся АТФ может сразу же утилизироваться в других реакциях (например, АТФазных).

Уже высказывалось соображение о том, что в большинстве тканей млекопитающих при физиологических условиях скорость дыхания вряд ли может лимитироваться концентрацией АДФ и F_n , так как существуют эндогенные источники, регулирующие их концентрацию в клетке. Кроме того, энергетическая регуляция в интактной клетке — сложный процесс, включающий работу различных внутриклеточных метаболических систем. Наконец, использование кислорода в клетке может быть связано не только с реакциями фосфорилирования. Поэтому стремление полу-

чить дыхательный контроль в интактных клетках по аналогии с изолированными митохондриями, по-видимому, не оправдано. Это демонстрируется на целом ряде примеров.

Описывая переход от состояния 3 к состоянию 4 в присутствии экзогенного АДФ в изолированных клетках печени, Ишихара [297] отмечал его «постепенность» в отличие от резкого «перегиба», наблюдаемого при дыхании изолированных митохондрий. Он связывал данное явление с проявлением АТФазной активности, гидролизующей АТФ, образованную в клетке и генерирующую некоторое количество АДФ. Это предположение подтверждается изменениями pH инкубационной среды, носящими колебательный характер. Более того, неоднократно отмечалось отсутствие стимулирующего действия АДФ на дыхание срезов тканей (при температуре 37°) и проявление четкого тормозящего ее эффекта [43, 45].

Использование экзогенной АДФ для получения дыхательного контроля в ряде случаев, по-видимому, возможно, если АТФазная активность подавлена, например, в присутствии экзогенной АТФ [615] или при пониженных температурах (20–22° С) [59, 60]. В последнем случае, однако, клеточный препарат млекопитающего перестает представлять интерес с физиологической точки зрения, так как специфические для данной ткани свойства и функции в нем уже не проявляются в полной мере из-за неадекватных условий инкубирования.

Оценку дыхательного контроля в интактной клетке, видимо, нельзя рассматривать в отрыве от ее функциональной активности, так как именно усиление последней является главной причиной, стимулирующей образование энергии и определяющей ее поступление на нужды эндогенных реакций. Следовательно, условия проявления дыхательного контроля в различных тканях будут неодинаковыми.

Для асцитных клеток, например, характерным является низкая концентрация внутриклеточного АДФ и субстратов, что ограничивает их эндогенное дыхание (состояние 1). Однако метаболизм эндогенных субстратов может быть резко усилен добавлением глюкозы. В этом случае наблюдается метаболический контроль дыхания, специфичный только для этих клеток и выражающийся в двухфазном ответе на добавление глюкозы: первичной 2–10-кратной кратковременной (20–60 с) стимуляции дыхания, связанной с образованием АДФ в гексокиназной реакции и ее

последующим прямым использованием в процессах фосфорилирования в дыхательной цепи без существенной интерференции с другими метаболическими путями (состояние 3); вторичном резком и продолжительном (до 15 мин) торможении дыхания, сопровождающемся накоплением АТФ (состояние 4) [146–149].

В мышечных клетках основной функцией является преобразование химической энергии в механическую работу, т. е. сокращение. Поэтому процесс сокращения может реализоваться лишь при непрерывном притоке АТФ.

Первый исследователь особенностей регуляции тканевого дыхания в сердце *in vitro* Рамирес [468] изучал проявление метаболического контроля в кусочках желудочка сердца лягушки толщиной 1–1,5 мм. Такие препараты обладают спонтанной электрической активностью и сокращаются при электрической стимуляции. При механическом сокращении кусочков, вызванном электрической стимуляцией, происходит окисление НАД. Изменения обнаруживаются очень быстро и достигают полумаксимальных значений после 2–4 сокращений, т. е. через 20–40 с. Однако их величина невелика и составляет всего 2–6% от общей степени восстановленности пиридиннуклеотидов. Так как в присутствии АДФ в сарколеммах обнаруживаются изменения, аналогичные тому, что наблюдается при сокращении мышцы, делается вывод, что во время мышечной активности высвобождается АДФ. Это же подтвердилось в исследованиях на перфузируемом сердце млекопитающих [167, 266]. В сердечной мышце можно наблюдать метаболический контроль дыхания при переходе от состояния покоя к активности при сокращении [586].

Аналогичные результаты были получены на скелетных мышцах. Люминесцентная реакция сокращающегося нервно-мышечного препарата в ответ на одиночное раздражение характеризуется фазностью и сопровождается окислительно-восстановительными превращениями пиридиннуклеотидов и флавинов, так же как и дыхательными изменениями. Это свидетельствует об активации дыхательной цепи, сопутствующей мышечному сокращению, и интерпретируется как результат увеличения внутриклеточной концентрации АДФ, связанного с увеличением расхода АТФ [144, 151, 162, 187, 307, 308, 310, 314, 584]. Ответ пиридиннуклеотидов и цитохрома b на сокращение становится более выраженным после предварительного восстановления этих компонентов в присутствии адекватных суб-

стратов. Этот факт свидетельствует об очень важном моменте, а именно о том, что митохондрии в интактной скелетной мышце находятся не в состоянии 4 (по Чансу), а скорее в состоянии 1, когда скорость потребления кислорода лимитируется содержанием АДФ. При этом уровень эндогенных субстратов очень низок и он не может обеспечить восстановления дыхательных переносчиков до значений, которые могли бы соответствовать состоянию 4. Однако образование эндогенных субстратов может происходить по ходу деятельности и они появляются уже после первого сокращения.

В нервной ткани большая часть образующейся энергии окислительного метаболизма тратится на функцию, сопряженную с транспортом катионов против электрохимического градиента. Формирование нервного импульса обеспечивается $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазой}$, которая является пейсмейкером 40–50% клеточного дыхания в нейронах и периферических нервах [286, 289, 394, 469, 516, 607]. Стимулируемое высокими концентрациями калия дыхание срезов мозга (как и в других тканях) является отражением активации $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазы}$ [108, 121, 204, 404, 453, 565, 607]. Энергозависимость этого процесса подтверждается подавлением его ингибиторами дыхательной цепи митохондрий [286, 289]. Активация работы цепи калием сопровождается соответствующими редокс-изменениями дыхательных переносчиков (рис. 16). При этом регистрируются двухфазные изменения (окисление $\rightleftharpoons$ восстановление) как для пиридиннуклеотидов и флавинов, так и для цитохромов [49]. Эффект зависит от субстратов окисления и оптимально воспроизводится в присутствии глюкозы и пирувата, что подтверждает его связь с аэробным гликолизом [49, 121, 122]. Стимуляция дыхания калием значительно сильнее выражена не на свежееизолированных срезах, а в более поздний временной период (например, через 60 мин) за счет появления нечувствительной к уабаину компоненты (см. рис. 16).

Изолированная нервная ткань (срезы мозга) может отвечать на электрическое раздражение обратимой деполяризацией клеточных мембран, коррелирующей с усилением метаболической, в том числе дыхательной активности [364, 375, 404]. Так же как *in vivo*, интенсивность гликолиза при этом увеличивается в 2–10 раз [394]. Эти изменения, специфичные для нервной ткани и не воспроизводимые на других невозбудимых тканях, например печени [187], соп-

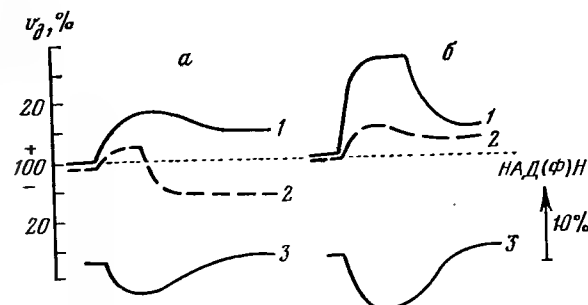


Рис. 16. Действие KCl ($3 \cdot 10^{-2}$ М) на дыхание срезов мозга (1, 2) и люминесценцию НАД (Ф) Н (3) через 5 (а) и 60 (б) мин после экстирпации

1, 3 — при окислении глюкозы; 2 — в присутствии строфантина

ряжены с обратимым уменьшением креатинфосфата, АТФ, а также с изменениями ионного обмена, выражающимися в быстром выходе K^+ из клеток и антипортном потоке Na^+ [187, 188, 375, 453]. Одновременно наблюдаются фазные окислительно-восстановительные превращения пиридиннуклеотидов и цитохромов [121, 122]. Реакция происходит только в присутствии специфического для мозга субстрата окисления — глюкозы. Без нее срезы не отвечают на электрическое раздражение ни усилением дыхания, ни редокс-изменениями дыхательных переносчиков [50].

Эти же изменения воспроизводятся на интактном мозге. Во время прямого электрического раздражения коры головного мозга в течение первых же нескольких секунд наблюдается окисление НАДН и цитохрома a, a_3 [270, 314, 349–351, 391, 432, 460]. Нормализация наблюдаемых редокс-изменений происходит в течение 20 с после прекращения раздражения. Окисление–восстановление пиридиннуклеотидов и цитохрома a, a_3 , сопровождаемые усилением–торможением дыхания и соответствующими изменениями в концентрации K^+ [187, 188, 349–350, 375, 381], наблюдаются на фоне вызванных потенциалов, а также во время корковой распространяющейся депрессии [350, 381, 391, 481, 482]. Эти изменения связываются с необходимостью восстановления внутриклеточной концентрации ионов после нейрональной активности не в глиальных клетках, а в нейронах, так как именно в последних обнаружена основная масса митохондрий (до 91%) [313].

Высокая сопряженность между электрофизиологическим ответом и окислительным метаболизмом была использована в качестве характерного показателя при изучении действия на энергоутилизирующую систему мозга различных агентов [253, 351] для определения скорости превращения АТФ в АДФ через $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу [350, 482], для выявления состояния митохондрий в биопсийном материале [527]. Все эти факты свидетельствуют о том, что реализация специфической функции клетки самым тесным образом коррелирует с дыханием и состоянием восстановленности дыхательных переносчиков. Поэтому проведение некоторых аналогий, касающихся параметров окислительного метаболизма, в том числе и метаболических состояний изолированных митохондрий в клеточных и тканевых препаратах, иногда бывает вполне возможным.

Однако наряду с этим проявляется и ряд принципиальных отличий, отражающих значительно более сложную организацию метаболических отношений в клетке. Исследования кинетики люминесценции дыхательных переносчиков в условиях *in situ* позволяют увидеть процесс переключения путей метаболической регуляции и проявление в связи с этим более сложных отношений, нежели окислительно-восстановительные превращения при переходе из состояния покоя к активности по Чансу. Так, при длительном (более 10 мин) сокращении мышцы в условиях высокой частоты стимуляции (10 Гц) происходит, по-видимому, изменение путей обеспечения субстратами, результатом чего является переход дыхательной системы митохондрий без снижения эффективности сокращения в новое стационарное состояние, характеризующееся более высокой степенью восстановленности пиридиннуклеотидов и флавопротеидов [21–23, 27].

Смена метаболической регуляции может наблюдаться и в более узких временных интервалах. Так, если частота раздражения не превышает 1 Гц, мышца отвечает на него увеличением дыхания и медленными фазными переходами по Чансу (окисление—восстановление дыхательных переносчиков). Однако при увеличении частоты свыше 1,5 Гц появляется дополнительный быстрый сигнал (30 с) на включение раздражителя (торможение дыхания—восстановление НАД(Ф)Н) и на его выключение (усиление дыхания—окисление пиридиннуклеотидов). Величина эффекта растет с увеличением частоты раздражения. В то

же время степень выраженности медленных изменений становится иной.

Эти факты свидетельствуют о том, что в условиях реализации специфической функции в клетке может происходить быстрая мобилизация ее внутренних резервов по ходу деятельности, направленная на обеспечение и поддержание оптимального уровня функциональной активности.

Направление редокс-изменений дыхательных переносчиков в условиях *in vivo* при переходе от состояния 3 к состоянию 4 качественно может не совпадать с тем, что известно для изолированных митохондрий. Например, во время активности коры головного мозга или спинного мозга цитохром a_1 не восстанавливается, а становится более окисленным [311–313]. Эффект не связан с изменениями местного кровотока во время усиления нейрональной активности, приводящими к увеличению локального pO_2 , так как он воспроизводится на возбужденном мозге черепахи, где снабжение кислородом происходит за счет его диффузии с поверхности [412]. Все это свидетельствует, с какой осторожностью следует проводить анализ активности дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования в интактной клетке.

Изменения окислительного метаболизма, связанные с восстановлением после нарушенной функции, обнаруживают еще более сложную и неожиданную картину. Например, во время корковой распространяющейся депрессии и судорожной активности пул пиридиннуклеотидов резко окисляется, что предполагает истощение энергетических ресурсов клетки. Но величина этой оксидации существенно больше, чем можно было бы ожидать из экстраполяции потерь внутриклеточного K^+ и оксидации НАДН, вызванной электростимуляцией средней силы [375]. Окислительно-восстановительные изменения цитохромов в этих же случаях значительно отличаются от реакции НАДН. Цитохромы b , c , и a , a_3 окисляются при распространяющейся депрессии. Однако при судорожной активности цитохром a , a_3 становится более восстановленным [312]. Тем не менее эта восстановленность только качественно совпадает с ответом изолированных митохондрий при переходе из стационарного состояния 4 к состоянию 3, так как объем ее значительно больше и свидетельствует о связи с другой причиной. Более того, окислительно-восстановительные ответы цитохрома a , a_3 могут меняться с возрастом животного [528]. У молодых крыс (4–5 мес.) на фоне вызванных

ответов и во время корковой распространяющейся депрессии происходит окисление цитохрома а, а₂. У старых же животных (24–25 мес.), имеющих такой же исходный уровень цитохрома а, а₂, вызванные ответы сопровождаются его окислением, а корковая распространяющаяся депрессия — восстановлением.

Все эти трудно интерпретируемые сегодня факты указывают прежде всего на то, что дыхательная цепь в условиях *in vivo* может иметь иную степень восстановленности дыхательных переносчиков, сравнительно с изолированными митохондриями. Специальные исследования этого вопроса подтвердили это предположение. Оказалось, что цитохромный участок дыхательной цепи *in vivo* находится в более восстановленном состоянии, а НАДН-зависимый — в более окисленном, чем *in vitro* [214, 270, 426, 460]. Набольшее различие с изолированными митохондриями обнаруживает цитохромоксидаза. В мозге, например, при вдыхании животными воздуха (нормоксия) цитохром а, а₂ восстановлен на 70–85% (против 1–4% в суспензии митохондрий), поэтому аноксия может изменить его не более, чем на 15% [270]. Эта исходно высокая степень восстановленности не связана с внутриклеточной гипоксией, так как *in vivo* ткань мозга в достаточной степени обеспечена кислородом [24, 411]. Максимальное окисление цитохрома а, а₂ не может быть достигнуто в обычных условиях даже в присутствии 100% кислорода. Оно имеет место лишь при вдыхании животными под высоким давлением (около 4 атм.) смеси, состоящей из 5% СО₂ и 95% О₂. В этих условиях наблюдается лимит по субстратам и митохондрии в клетке находятся в состоянии, близком к состоянию 2 по Чансу («истощенные митохондрии») [312–313].

Высокий уровень восстановленности терминального участка дыхательной цепи, не характерный для изолированных митохондрий, показан для всех тканей, выполняющих транспортную функцию: слизистой желудка [273, 274], кишки шелковичного червя [384], желудочка сердца жабы [412, 468], сокращающегося сердца крысы [225, 266], каротидного тела крысы [403], сердца собаки *in situ* [516]. Во всех этих органах и тканях увеличение активности, сопровождающееся усилением метаболизма, как и в мозге, протекало на фоне окисления цитохрома а, а₂. Исключение составляют сокращающаяся скелетная мышца жабы и лягушки, желудочек сердца лягушки и ductus arteriosus морской свинки [307, 308, 310, 314], а также пе-

чень, у которой *in situ* степень окисленности цитохрома а равна 96%, а цитохрома а₂—99% [309].

Степень восстановленности дыхательных переносчиков в изолированных клетках также отличается от изолированных митохондрий. Высокая степень восстановленности была показана, например, для цитохрома с в клетках печени (*t*=25°), хотя она была меньше, чем для цитохрома а, а₂ [598]. В связи с этим первоначально было высказано предположение, что в клеточных препаратах сродство цитохромоксидазы к кислороду меньше, чем *in vitro* [309, 310]. Однако расчеты, проведенные для изолированного мозга, показали, что изменение свободной энергии при передаче двух электронов на кислород в этом случае составляет 8 ккал, что термодинамически достаточно для фосфорилирования АТФ в АДФ [270]. Все это вместе взятое свидетельствует о том, что проблема регулирования энергетического обмена в интактной клетке не может решаться только по аналогии с изолированными митохондриями, а требует своего самостоятельного рассмотрения.

ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ В КЛЕТКЕ

Исторически сложилось так, что изучение факторов, регулирующих дыхание и энергообмен в клетке, шло параллельно исследованию этого вопроса на изолированных митохондриях [140, 144–146, 148–151, 162, 167, 498]. Поэтому по мере того, как становились очевидными ограничения, связанные с использованием «кинетического» контроля дыхания по Чансу, появились работы, акцентирующие внимание на регуляторной роли адениннуклеотидов в различных метаболических реакциях в клетке. Основываясь на них, в 1966 г. Эткинсон предположил, что энергетический гомеостаз в клетке зависит от «энергетического заряда», определяемого как [84]:

$$([АТФ] + 1/2 [АДФ]) / ([АТФ] + [АДФ] + [АМФ]). \quad (15)$$

Согласно его представлениям именно это отношение регулирует всю последовательность реакций окислительного фосфорилирования и от него зависит баланс АТФ-утилизирующих и АТФ-продуцирующих реакций. Чтобы осуществить свою регуляторную функцию в клетке, «энергетический заряд» должен поддерживаться за счет взаимодействия соответствующих метаболических реакций на

уровне значений, равных 0,8—0,95 [84]. Из уравнения (15) следует, что существенная роль в регуляции отводится концентрации АМФ.

Следует, однако, отметить, что наиболее полноценный фактический материал, касающийся проблемы регулирования дыхания в клетке, накоплен последователями Клингенберга и сторонниками концепции «термодинамического» контроля дыхания. Появление в рамках этой концепции «равновесной модели окислительного фосфорилирования», предложенной Уилсоном и сотрудниками [209, 524, 594, 597], требовало проверки возможности ее применения на клеточном и органном уровне. Это было выполнено на широком спектре клеточных объектов, у которых были измерены различные параметры, характеризующие как электронтранспортную функцию дыхательной цепи (скорость дыхания, выраженную как число оборотов цитохрома с; редокс-состояние пары НАД), так и состояние фосфорилирования адениннуклеотидов [206, 214, 332, 426, 604, 605].

Именно благодаря этим работам удалось установить, что общим, характерным для митохондрий в условиях *in situ*, отличающим их от свойств изолированных препаратов, являются большая окисленность редокс-пары НАД⁺/НАДН сравнительно с изолированными митохондриями, значительно более высокая степень восстановленности цитохрома с (20—35%) и еще более высокая степень восстановленности цитохрома а, а₃. Тем не менее индивидуальные параметры, характеризующие процесс окислительного фосфорилирования, могли варьировать в широких пределах (табл. 7).

Так, например, клетки печени и почек имеют близкие значения числа оборотов цитохрома с, высокую окисленность митохондриальных пиридиннуклеотидов в отсутствии субстратов, высокую степень восстановленности цитохрома с, а также высокие значения отношения [АТФ]/[АДФ] [Ф_н].

Перфузируемое сердце принципиально отличается от двух первых типов клеток: а) большим содержанием цитохрома с (в 2,5 раза — больше, чем в печени и почках); б) большим числом оборотов цитохрома с (также в 2,5 раза сравнительно с первыми двумя типами клеток); в) значительно более высоким (в 3—4 раза) отношением [АТФ]/[АДФ] [Ф_н]; г) значительно более высокой степенью восстановленности пиридиннуклеотидов (отноше-

Таблица 7. Характеристики клеточного дыхания [214]

Объект	Скорость дыхания, $\text{мк-моль } \text{O}_2 / \text{мин} \cdot \text{мг}$	Число оборотов цитохрома с, (электрон/с)	$\frac{[\text{НАД}^+]}{[\text{НАДН}]}$	Концентрация цитохрома с		$\frac{\text{АТФ}}{[\text{АДФ}]} [\text{Ф}_n] \cdot \text{М}^{-1}$
				$\text{мк-моль } \Gamma$	% восстановленности	
Изолированные клетки печени	1,07	5,7	$4,1 \times 10^3$	0,02	18	1505
Культура клеток почек	1,29	5,35	$1,8 \times 10^2$	0,016	25	2000
Перфузируемое сердце	10,6	13,9	2,44	0,051	—	7890
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	4,2	13,9	$2,3 \times 10^2$	0,02	30	429
<i>Candida utilis</i>	9,2	51,1	—	0,012	76	1216

ние [НАД⁺]/[НАДН] в 100 раз меньше в сердце по сравнению с печенью и почками).

Для сравнения в табл. 7 приведены данные, касающиеся состояния дыхательной цепи у некоторых простейших. Из них представитель простейших жгутиковых *Tetrahymena pyriformis* имеет двухмембранную структуру митохондрий и дыхательную цепь, организованную сходным образом с дыхательной цепью млекопитающих (окисление НАД-зависимых субстратов происходит с обычной эффективностью, свидетельствующей о наличии трех пунктов фосфорилирования). Атипичность этой дыхательной цепи состоит в том, что ее терминальной оксидазой является цитохром а₂, выполняющий, по-видимому, функции цитохрома а₃ [332]. Из табл. 7 видно, что концентрация цитохрома с и редокс-состояние пары НАД в этих клетках такие же, как и в клетках печени и почек. Однако число оборотов цитохрома с было в 3 раза выше и близко к значениям, показанным для перфузируемого сердца. В отличие от последнего митохондриальные пиридиннуклеотиды были в 100 раз больше окислены и отношение [АТФ]/[АДФ] [Ф_н] было почти в 20 раз меньше.

Наконец, у дрожжей *Candida utilis* концентрация цитохрома с была ниже, чем во всех остальных исследован-

ных типах клеток, тогда как значения $[АТФ]/[АДФ]$ $[Ф_n]$ очень сходны с полученными для печени и почек [214]. Наиболее удивительным было высокое число оборотов цитохрома с, свидетельствующее о высокой интенсивности дыхания этих клеток (~50 электрон/с), которое коррелировало с очень высокой степенью восстановления цитохрома с и было обусловлено известным свойством митохондрий дрожжей окислять немитохондриальный НАДН через альтернативный путь, шунтирующий первый пункт фосфорилирования [37]. Восстановительные эквиваленты от немитохондриального НАДН в этом случае передаются на убихинон дыхательной цепи в необратимую по существу реакцию, что и является причиной высокой окисленности митохондриального пула пиридин-нуклеотидов ($[НАД^+]/[НАДН]$ митохондриальное равно 0,1).

Таким образом, различные типы клеток характеризовались неодинаковыми метаболическими состояниями. Однако расчеты показали, что для всех них без исключения, так же как и для изолированных митохондрий, редокс-реакции между парой НАД и цитохромом с находились в практическом равновесии с состоянием фосфорилирования адениннуклеотидной системы и их взаимоотношения могли быть описаны уравнениями (12) и (13). В связи с этим изменения свободной энергии на участке цепи НАД—цитохром с, связанные с переносом двух восстановительных эквивалентов, были практически равны (в пределах экспериментальной ошибки) свободной энергии синтеза двух молей АТФ из АДФ и $Ф_n$ (табл. 8). Следовательно, наблюдаемое практическое равновесие между окислительно-восстановительными реакциями дыхательной цепи и отношением $[АТФ]/[АДФ]$ $[Ф_n]$ цитозоля поддерживается не только в различных клетках млекопитающих, в том числе и таких высокоспециализированных, как сердце и печень, но и у филогенетически примитивных организмов с атипичной дыхательной цепью, что свидетельствует об общности наблюдаемого феномена.

Таким образом, гомеостатическая регуляция энергетического метаболизма и связанного с ним потребления кислорода имеет сравнительно простую основу. В каждом случае поддерживается практическое равновесие между переносом восстановительных эквивалентов от митохондриальной пары НАД к цитохрому с и фосфорилированием АДФ цитозоля в АТФ, которое, как и в случае изолиро-

Таблица 8. Отношение свободной энергии в окислительно-востановительных реакциях дыхательной цепи и синтеза АТФ [212]

Объект	Е цитохрома с, В	Е _{НАДН} , В	ΔЕ, В	ΔG _{ок. - вост.} , ккал/2е	ΔG _{АТФ} , ккал/2 АТФ	ΔΔG, ккал	Источник
Клетки печени (без субстрата)	0,272	-0,242	0,514	23,7	23,8	-0,1	[604]
Клетки печени (лактат + этанол)	0,269	-0,260	0,529	24,4	24,2	0,2	[604]
Перфузируемая печень (без субстрата)	0,253	-0,263	0,516	23,8	23,6	1,2	[605]
Клетки аспитной опухоли	0,260	-0,270	0,530	24,4	23,6	0,8	[605]
Культура клеток почки	0,274	-0,252	0,523	24,1	24,2	-0,1	[211]
Tetrahymena pyriformis (клетки)	0,251	-0,236	0,487	22,5	22,4	0,1	[214]
Митохондрии сердца голубя (сукцинат)	0,270	-0,343	0,613	28,4	29,8	-1,4	[206]

$$\text{Обозначения. } E = E_{\text{НАД}} - E_{\text{цит с}}, \text{ где } E = E_0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{[\text{ок}]}{[\text{восст.}]}; \Delta G_{\text{ок. - вост.}} = -nFE; \Delta G_{\text{АТФ}} = \Delta G_0 + 1,36 \log \frac{[\text{АДФ}][Ф_n]}{[\text{АТФ}]}$$

$$\Delta \Delta G = \Delta G_{\text{ок. - вост.}} - \Delta G_{\text{АТФ}}$$

ванных митохондрий, описывается уравнением (13). При увеличении энергетических трат, связанных с функциональной активностью клетки, изменения концентрации внутриклеточного фосфора будут влиять на величину отношения $[АТФ]/[АДФ]$ таким образом, чтобы в целом могло поддерживаться постоянство отношения $[АТФ]/[АДФ][Ф_n]$ и скорости дыхания [268, 291, 337].

Регуляторная роль неорганического фосфата отчетливо демонстрируется именно в интактных клетках. Резкое уменьшение внутриклеточного $Ф_n$ наблюдается в клетках дрожжей, растущих на среде, бедной фосфором, а также в различных клетках (в том числе и гепатоцитах) в присутствии субстратов, ведущих к образованию фосфорилированных интермедиатов, уменьшающих внутриклеточную концентрацию $Ф_n$ (глицерола, фруктозы, Д-дезоксиглюкозы) [208, 212]. Оно сопровождается резким уменьшением отношения $[АТФ]/[АДФ]$ и изменением энергетического заряда до 0,58 [208, 211, 212, 214]. Однако редокс-отношение $[НАД^+]/[НАДН]$ и пары цитохрома с, скорость дыхания и величина отношения $[АТФ]/[АДФ][Ф_n]$ меняются сравнительно мало. Аналогичные изменения, сопровождающиеся уменьшением АТФ и отношения $[АТФ]/[АДФ]$, были показаны на перфузируемой печени [226].

Из этих экспериментов следует чрезвычайно важный вывод о том, что транспорт $Ф_n$ в клетку является регулируемым процессом. Действительно, в обычных условиях внутриклеточная концентрация $Ф_n$ выше, чем внеклеточная, т. е. его поступление в клетку направлено против концентрационного градиента. Более того, скорость поступления $Ф_n$ в клетку, видимо, лимитирована, так как в присутствии глицерола и фруктозы, т. е. в условиях его быстрой внутриклеточной утилизации, этот дефицит не компенсируется скоростью поступления $Ф_n$ из внеклеточной жидкости. В связи с этим происходит резкое падение его концентрации в клетке до значений, существенно более низких, чем содержание $Ф_n$ во внеклеточной жидкости. Способность клетки регулировать потребление фосфата означает, что в физиологических условиях его концентрация должна стремиться оставаться постоянной. Именно в этом случае создается видимость регуляции дыхания через отношение $[АТФ]/[АДФ]$. Однако в таких тканях, как мозг и мышца, где по метаболическим причинам должен поддерживаться высокий уровень АТФ, ре-

гуляция дыхания (например, его стимуляция) будет осуществляться через увеличение внутриклеточной концентрации $Ф_n$ за счет гидролиза креатинфосфата [41, 213, 436, 484]. Таким образом, $Ф_n$ действительно включается в качестве необходимого компонента общей регуляторной системы, обеспечивающей стабильность клеточного дыхания.

Признание факта, что первичным регулятором дыхательного метаболизма является фосфорилирующее состояние адениннуклеотидной системы, делает необходимым обсуждение вопроса о значимости «энергетического заряда» Эткинсона. Этот параметр связан исключительно с эффектом, определяемым поведением индивидуальных адениннуклеотидов (см. уравнение 15). Его регуляторная функция состоит в поддержании этого пула постоянным, а это не требует изменения внутриклеточной концентрации $Ф_n$. Таким образом, «энергетический заряд» исключает роль внутриклеточной концентрации $Ф_n$ и в качестве первичного регулятора выдвигает АМФ, концентрация которой определяется аденилаткиназной реакцией [97].

В отличие от этого фосфорилирующее состояние адениннуклеотидной системы прямо связано с изменениями свободной энергии гидролиза АТФ и включает в регуляторную систему концентрацию $Ф_n$, предполагая лишь не прямое влияние концентрации АМФ. Окончательное решение спора может быть только при непосредственном сравнении изменений обеих величин, обсуждаемых в конкретных условиях. При этом следует отметить, что чем больше корреляция между регуляторными параметрами, ответственными за поддержание и обеспечение клеточного гомеостаза, и метаболической активностью клеток, тем в условиях *in vivo* будут меньше заметны колебания системы в целом. Проведение таких сравнений действительно показало, что наиболее стабильным при моделировании самых различных метаболических состояний является не «энергетический» заряд, а фосфорилирующее состояние адениннуклеотидной системы [207, 208, 211, 212]. Так, например, после добавления фруктозы отношение $[АТФ]/[АДФ]$ уменьшалось в 8 раз, энергетический заряд — на 30%, а изменение свободной энергии гидролиза АТФ, определяемое как функция отношения $[АТФ]/[АДФ][Ф_n]$, составляло менее 5%, что лежит в пределах точности измерения [208, 212].

Следует оговорить, однако, что в тех случаях, когда внутриклеточная концентрация фосфата не меняется и аденилаткиназная реакция близка к равновесию [97], энергетический заряд может иметь такое же регуляторное значение, как и отношение $[АТФ]/[АДФ]$ $[Ф_n]$. В различных клетках это отношение равно $7 \cdot 10^2 M^{-1}$ — $4 \cdot 10^3 M^{-1}$, что существенно больше, чем в изолированных митохондриях, для которых показаны значения $4 \cdot 10^2 M^{-1}$ [174, 209, 515]. Однако в случае изменения внутриклеточной концентрации фосфата поведение «энергетического» заряда отличается от изменений отношения $[АТФ]/[АДФ]$ $[Ф_n]$.

Обеспечение регуляции клеточного дыхания через концентрационные взаимодействия ограниченного числа метаболитов, отдельные компоненты которого включены в него на равноправных началах, выдвигает этот механизм на особое место в жизнедеятельности клетки. Благодаря ему дыхательная цепь не только становится главным поставщиком АТФ для большинства эндогенных функций и процессов в клетке, но и производит метаболиты (НАДН, АДФ, $Ф_n$), которые являются либо необходимыми компонентами других метаболических систем, либо даже их регуляторами. Тем самым активность этих систем также становится зависимой от отношения $[АТФ]/[АДФ]$ $[Ф_n]$, что делает его принципиально важным регуляторным фактором клеточного метаболизма в целом. В то же время этот механизм исключительно прост и это обеспечивает ему широкий диапазон действия [208, 426, 427, 594]. Показаны, например, обратная зависимость между внутриклеточной концентрацией $Ф_n$ и содержанием гликогена в гепатоцитах и прямая связь между последней величиной и содержанием Гл-6-Ф [426, 427]. Таким образом, фосфорилирующее состояние цитозоля включается в установление взаимодействия гликолиза и процесса фосфорилирования.

Установление регулирующей роли $Ф_n$ в процессе окислительного фосфорилирования и клеточного дыхания вносит определенные коррективы в вопрос о значимости реакции транслоказы адениннуклеотидов.

Внутримитохондриальная мембрана непроницаема для АТФ и АДФ. В то же время известно, что в клетке имеется два пула адениннуклеотидов: митохондриальный и немитохондриальный. Первый в состоянии 4 в 10—100 раз меньше, чем второй [191, 203, 268, 515, 563, 606]. Взаимодействие этих пулов осуществляется с помощью специфического переносчика, локализованного во внутренней мембране митохондрий — транслоказы адениннуклеотидов.

В неэнергизованной мембране транспорт адениннуклеотидов является симметричным, в энергизованной обмен регулируется в пользу поглощения АДФ (в виде аниона $АДФ^{3-}$) и выброса АТФ (в виде аниона $АТФ^{4-}$) и контролируется величиной мембранного потенциала на митохондриальной мембране, генерируемого в ходе транспорта электронов в дыхательной цепи, т. е. является энергозависимым. В настоящее время дискутируется вопрос о том, до какой степени транспорт адениннуклеотидов связан с синтезом АТФ [336]. Так как он происходит в условиях конкурентных отношений между АДФ и АТФ за переносчик, то при наличии стационарной концентрации $Ф_n$ транслоказа адениннуклеотидов действительно участвует в контроле дыхания [191, 347, 563]. Имеются данные, показывающие, что существует линейная зависимость скорости дыхания от концентрации атрактилозида — ингибитора специфического переносчика адениннуклеотидов [563]. Однако роль $Ф_n$ в регуляции клеточного дыхания свидетельствует против того, что транслоказа может быть фактором, лимитирующим дыхание в физиологических условиях, так как эта реакция является независимой от него и требует его исключения из этого процесса [207, 208, 291, 446, 603].

Имеются и другие доказательства против участия этой реакции в регуляции процесса окислительного фосфорилирования. Если вся система окислительного фосфорилирования находится в равновесии, то и все промежуточные реакции должны находиться в равновесии. Это не означает, что состояния фосфорилирования внутри и вне митохондрий идентичны. Но из этого следует, что обмен адениннуклеотидов и $Ф_n$ через внутреннюю митохондриальную мембрану с цитозольным пулом должен происходить без потери свободной энергии. Этот принцип термодинамического равновесия действительно выполняется, что и было продемонстрировано Уилсоном и соавторами [207, 291, 446]. Данный факт находится в соответствии с представлениями, развиваемыми Клингенбергом [268, 336], который постулировал, что 20—30% общей свободной энергии адениловой системы цитозоля поставляется за счет электрогенного транспорта адениннуклеотидов против концентрационного градиента и только 70—80% связано непосредственно с синтезом АТФ в митохондриях.

Убедительные доказательства против того, что транслоказа адениновых нуклеотидов является лимитирующим звеном дыхания, получены на бактериальной клетке *Paracoccus denitrificans* [206]. Поскольку синтез АТФ у бактерий происходит в дыхательной цепи, локализованной на клеточной мембране, то компартиментализация адениновых нуклеотидов и, следовательно, их перенос против концентрационного градиента в этом случае отсутствуют. Оказалось, что у таких клеток выполняется равновесие между процессом синтеза АТФ и редокс-реакциями в дыхательной цепи так же, как это происходит в клетках, содержащих митохондрии. Т. е. для клеток, у которых нет переносчика адениновых нуклеотидов, требуется столько же свободной энергии для обеспечения процесса окислительного фосфорилирования, сколько и в клетках, где АТФ синтезируется в митохондриях и затем переносится в цитозоль.

Итак, термодинамическая равновесная модель контроля дыхания и окислительного фосфорилирования позволяет выявить основные закономерности и общие принципы регулирования работы дыхательной цепи. Она хорошо аргументирована, отличается достаточной простотой и экспериментально подтверждается на самых различных биологических объектах. Дальнейшее практическое применение этой модели направлено на то, чтобы учесть взаимодействия различных метаболических потоков, участвующих в энергообмене, например гликолиза и дыхательной цепи [426, 427, 594].

Проблема взаимодействия процесса окислительного фосфорилирования с другими метаболическими системами клетки может решаться с помощью различного рода кинетических моделей. Их рассмотрение не входит в нашу задачу. Отметим лишь, что такие исследования успешно развиваются, например, в работах Е. Е. Селькова, В. В. Дынина и др. [14—17]. В их кинетических моделях, описывающих взаимодействие, роль и вклад в энергетику различных подсистем энергетического метаболизма (например, гликолиза и ЦТК), учтена не только стехиометрическая регуляция скоростей АДФ-зависимых реакций, но и аллостерический контроль ряда ключевых ферментов (гликогенфосфорилазы, фосфофруктокиназы, пируватдегидрогеназы, цитратсинтетазы и изоцитратдегидрогеназы), обеспечивающих поддержание «диапазона стабилизации АТФ» (изменения концентрации АТФ

при максимальных физиологических нагрузках составляют не более 20%). Этими же авторами рассмотрены кинетические возможности осуществления аллостерической регуляции ЦТК такими регуляторами, как НАДН и F_1 .

Аллостерическая регуляция ферментов играет, как известно, огромную роль в жизнедеятельности клетки. Так, например, контроль ЦТК через адениновые нуклеотиды осуществляется на уровне окислительного превращения изоцитрата в α -кетоглутарат. Фермент изоцитратдегидрогеназа, катализирующий эту реакцию, ингибируется АТФ и активируется АДФ (он также аллостерически ингибируется с помощью НАДН и стимулируется с помощью НАД). Когда потребность клетки в АТФ уменьшается и АТФ начинает накапливаться, фермент ингибируется возрастающей концентрацией АТФ и активность ЦТК уменьшается, что приводит к соответствующему снижению скорости генерации АТФ. В случае увеличения энерготрат клеткой, уменьшение внутриклеточного АТФ ослабляет ингибирование изоцитратдегидрогеназы, а сопутствующее увеличение концентрации АДФ оказывает стимулирующий эффект на активность фермента и, следовательно, на весь ЦТК. Аналогичным аллостерически регулируемым ферментом в системе гликолиза является фосфофруктокиназа, ответственная за фосфорилирование фруктозы-6-фосфата. Реакция, катализируемая ею, является лимитирующим звеном в гликолизе, и этот фермент ингибируется АТФ и стимулируется АДФ (или, возможно, АМФ). Таким образом, гликолиз, как и ЦТК, обладая высокой чувствительностью к уровню АТФ и АДФ клетки, функционально связан с процессом окислительного фосфорилирования. Дополнительно к этому, фосфофруктокиназа аллостерически ингибируется цитратом. Последнее служит решающей регуляторной связью между гликолизом и ЦТК, так как обеспечивает точную синхронность скоростей этих двух процессов: когда уровень цитрата в клетке поднимается за счет перепроизводства пирувата, ацетил КоА и цитрата, активность гликолитического пути фактически снижается, так как цитрат, ингибируя фосфофруктокиназу, обратимо превращает фермент в его неактивную форму. Все эти примеры демонстрируют многочисленные (и не исчерпывающие) способы, с помощью которых различные части дыхательного метаболизма интегрируются и с большой точностью и эффективностью приспосабливаются к энергетическим запросам клетки.

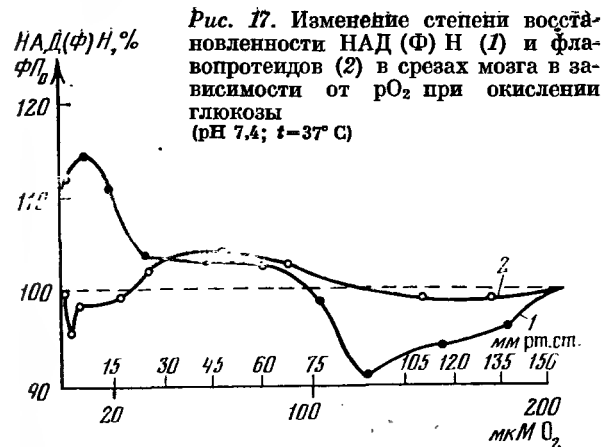
МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ДЫХАНИЯ ПРИ НИЗКИХ pO_2

Процесс образования АТФ в митохондриях стехиометрически сопряжен с восстановлением кислорода и ответствен за большую часть потребляемого клеткой кислорода, которая может быть мерой его синтеза. Поэтому в терминах равновесной термодинамики контроль дыхания выражается через необратимую реакцию [595]:



Это еще раз подчеркивает, что митохондриальное дыхание определяется тремя переменными: 1) степенью восстановления переносчиков электронов дыхательной цепи на субстратном ее участке; 2) степенью энергизации клетки, оцениваемой по величине отношения $[AT\Phi]/[AD\Phi] [\Phi_H]$ цитозоля; 3) скоростью окисления цитохрома с цитохромом с оксидазой и молекулярным кислородом, которая зависит от pO_2 . Т. е. концентрация кислорода может быть лимитирующей стадией всего процесса. Согласно уравнению (16) поддержание стационарной скорости утилизации кислорода при уменьшении pO_2 должно компенсироваться изменениями других сопряженных параметров.

Это полностью подтвердилось на различных типах клеток (культура почек, нейробластома, асцитные клетки, бактерии) [595, 596, 604, 602]. Стабильность их дыхания при 22–25° С и pO_2 от 200 мкМ (примерно 120 мм рт. ст.) вплоть до 10–20 мкМ обеспечивалась увеличением содержания восстановленного цитохрома с (от 22–25 до 25–40%) и уменьшением отношения $[AT\Phi]/[AD\Phi] [\Phi_H]$ цитозоля примерно в 3 раза (преимущественно за счет увеличения $AD\Phi$ и Φ_H) при сохранении отношения $[НАДН]/[НАДН]$ близким к постоянному. Значимые изменения последнего наблюдались лишь в очень низких областях значений pO_2 (меньше 20 мкМ). Эти данные наглядно демонстрируют зависимость митохондриальной функции от pO_2 в диапазоне значительно более высоких его значений, чем предполагалось ранее. Таким образом, система дыхательного контроля устроена так, что изменения уровня восстановленности цитохрома с происходят задолго до того, как кислород становится лимитирующим фактором транспорта электронов. Следует



отметить, что сходные с этим результаты были получены нами на срезах мозга и печени. В условиях снижения pO_2 не удавалось регистрировать изменения степени восстановления НАД(Ф)Н и окисленности флавопротеидов в диапазоне 60–30 мм рт. ст. (рис. 17).

Физиологическая роль такой регуляции очень велика. Она означает прежде всего, что процесс окислительного фосфорилирования и образование АТФ в клетке точно согласованы с ее потребностями. Т. е., если клетка использует АТФ с постоянной скоростью, а pO_2 уменьшается, регуляторные параметры должны стремиться сохранить без изменений скорость синтеза АТФ и стехиометрически связанный с ним процесс дыхания. Скорость потребления кислорода будет снижаться лишь тогда, когда: а) либо уменьшится скорость утилизации АТФ клеткой благодаря падению АТФ или регуляторному ингибированию этой реакции; 2) либо будет активирован альтернативный источник АТФ (гликолиз), что компенсирует часть потребностей клетки в энергии; 3) либо митохондрии не смогут более образовать АТФ с необходимой скоростью для поддержания нужных значений отношения $[AT\Phi]/[AD\Phi] [\Phi_H]$.

Исключительная чувствительность энергетического метаболизма клетки к изменению pO_2 даже при высоких его концентрациях (порядка 100 мкМ, что приблизительно равно 60 мм рт. ст.) может лежать в основе способности самых различных тканей и специфических хеморецепторов поддерживать постоянным уровень локального pO_2

путем быстрого и эффективного регулирования системного и местного кровотока.

При уменьшении pO_2 от 40 до 1 мкМ (25 мкМ — менее 1 мм рт. ст.) отношение $[ATP]/[ADP] [P_n]$ в клетках снижается более чем в 3 раза и это может быть использовано как сигнал для увеличения капиллярного кровотока. Компенсаторный ответ отношения $[ATP]/[ADP] [P_n]$ обеспечивает «рецепцию» кислорода в клетке, поэтому может рассматриваться в качестве «метаболического сенсора» кислорода [212].

В то же время способность регулировать дыхательную активность через изменения редокс-состояния цитохрома с и отношение $[ATP]/[ADP] [P_n]$ даже в области низких значений pO_2 и тем самым замедлять ее падение подразумевает, что не может быть какого-либо одного значения $K_m(O)$ для сложной биологической системы. Вариабельность кажущихся $K_m(O)$ не только для клеток, но и для изолированных митохондрий рассматривалась выше. Она свидетельствует в том числе и о том, что для каждого данного конкретного состояния имеется свое значение $K_m(O)$. Уилсон и соавторы [601] подтвердили этот вывод, получив семейство кривых V_n/pO_2 для разных значений отношения $[NAD^+]/[NADH]$ (от 0,001 до 1000) при одном и том же отношении $[ATP]/[ADP] [P_n]$. Кажущаяся $K_m(O)$ могла изменяться от 2,1 до 45–50 мкМ. И наоборот, при равных значениях для отношения $[NAD^+]/[NADH]$ изменение отношения $[ATP]/[ADP] [P_n]$ в пределах $(3 \cdot 10^3 M^{-1} - 3 \cdot 10^4 M^{-1})$ приводило к изменению $K_m(O)$. Вариабельность кажущейся $K_m(O)$ в клетке является, видимо, одним из механизмов ее приспособления к условиям кислородной недостаточности, который позволяет ей выжить при острой гипоксии, и говорит о том, что цитохромоксидаза не подчиняется простой кинетике Михаэлиса—Ментена. Последний факт был подтвержден экспериментально [210].

Все это ставит под сомнение смысловую значимость использования кажущейся $K_m(O)$ в клетке для определения чувствительности последней к гипоксии. Термин «критическое напряжение кислорода» предполагает, что имеется некое фиксированное значение pO_2 , выше которого ткань находится в условиях нормальной оксигенации, а ниже — в гипоксической зоне. Приведенные здесь и в предыдущей главе данные показывают, что это не так. Видимо, существует широкий ряд значений pO_2 , в пределах

которых ткань может изменять свою метаболическую активность, чтобы компенсировать субоптимальное снабжение кислородом. В то же время эти данные позволяют вернуться к дискуссии о концентрационном градиенте pO_2 в клетке, доказательство существования которого вытекало из наличия разных значений $K_m(O)$ для клеток и изолированных митохондрий [155, 316].

Против существования концентрационных градиентов между различными клеточными компартментами свидетельствует очень простой опыт. Если в суспензии изолированных митохондрий искусственно создаются условия, переводящие их в метаболическое состояние, сходное с *in situ* (например, при увеличении отношения $[ATP]/[ADP] [P_n]$), характер зависимости V_n/pO_2 становится таким же, как в изолированных клетках, и $K_m(O)$ увеличивается [601]. Измерения окисления гемоглобина в дрожжах [618] также не дали возможности обнаружить внутриклеточный градиент напряжения кислорода, несмотря на то что эти клетки отличаются высокой дыхательной активностью. Так как гемоглобин в дрожжевых клетках находится в цитозоле и, вероятно, рассредоточен вокруг митохондрий, он должен был бы выявить градиенты напряжения кислорода, если они только действительно существуют.

В силу того что в изолированных клетках (в отличие от изолированных митохондрий) пиридиннуклеотиды в высокой степени окислены, они мало чувствительны к изменениям pO_2 .

Начиная с определенной величины, которая может характеризоваться как переход в область гипоксической зоны (приблизительно 20 мкМ кислорода), степень восстановления цитохрома с становится настолько высокой (до 40% при температуре 22–25° С), что приводит к резкому снижению энергетического уровня клетки. Однако и в этой области изменения отношения митохондриального пула $[NAD^+]/[NADH]$ сравнительно невелики и пул митохондриальных пиридиннуклеотидов может оставаться преимущественно окисленным ($[NAD^+]/[NADH] = 5-20$). Только при значениях pO_2 меньше 2,5 мкМ происходит 50%-ное восстановление НАД [601]. Таким образом, внутримитохондриальное отношение $[NAD^+]/[NADH]$, не очень чувствительное к подострой гипоксии, может явиться важным индикатором тяжелой гипоксии (аноксии) в клетках и тканях.

Все изложенное выше свидетельствует в пользу высокой действенности термодинамического контроля дыхания, главным отправным моментом которого является поддержание равновесного редокс-состояния дыхательных переносчиков на участке НАДН—цитохром с с митохондриальным отношением $[АТФ]/[АДФ] [F_H]$. Это, в свою очередь, подразумевает, что лимитирующей стадией процесса, осуществляющей общий контроль за процессом окислительного фосфорилирования при уменьшении pO_2 , является терминальный этап окисления, связанный с активностью цитохром с оксидазы.

Согласно современным представлениям цитохром с оксидаза является типичным интегральным мембраносвязанным белком, который, подобно другим компонентам дыхательной цепи и митохондриальному АТФазному комплексу, локализован на внутренней мембране митохондрий [106, 160, 210, 212, 213, 363, 598]. Функциональная единица фермента состоит из четырех одноэлектронных центров: двух гемов (цитохромы а и a_3) и двух атомов меди. У одного из атомов меди («видимая медь») — низкий потенциал ($E_m = 0,245$ В), у второго («невидимая медь») — высокий ($E_m = 0,34$ В). Находится он в тесной функциональной и структурной связи с цитохромом a_3 [210, 363, 598, 599]. Сильные гем—гем-взаимодействия делают возможным рассматривать весь комплекс как единое целое. Однако (согласно классическим представлениям) цитохром а и цитохром a_3 не только функционально, но и структурно различаются [327]. Первый не является аутоокисцабельным и взаимодействует с восстановленной формой цитохрома с. Цитохром с локализован на внешней стороне митохондриальной мембраны и является исключительно донором электронов при физиологических рН, когда он находится в связанной с митохондриальной мембраной форме [205, 600].

В отличие от этого цитохром a_3 аутоокисцабелен.

«Невидимая» медь рассматривается как важный участник реакции с молекулярным кислородом, играющий ключевую роль в формировании активной стороны цитохромоксидазы и образовании промежуточного стабильного продукта $a_3^{3+} \cdot O_2^{2-} \cdot Cu^{2+}$ [156, 157, 159, 160, 210, 212, 213, 600]. Работами Чанса показано, что этот этап необходим для того, чтобы предотвратить высвобождение токсических продуктов при окислительно-восстановительных превращениях кислорода. Если бы они образовывались и выделялись

во внешнюю среду, то при скоростях, характеризующих активность цитохромоксидазы, создавались бы условия, способствующие существенному увеличению уровня продуктов, инициирующих перекисное окисление липидов и нарушающих функцию клетки.

В настоящее время обсуждаются различные модели, описывающие этот этап окислительно-восстановительных превращений переносчиков электронов [156, 157, 160, 210, 601]. Однако общим для всех них является образование стабильного комплекса цитохрома a_3 , восстановленной формы «невидимой» меди и кислорода [пероксид (по Уилсону), комплекс С (по Чансу), оксигенированная оксидаза (по Гринвуду, Ори и Кингу)]. Точная идентификация промежуточных продуктов затруднена по техническим причинам. В результате всего цикла происходит перенос четырех восстановительных эквивалентов к молекулярному кислороду без высвобождения O_2^- или H_2O_2 и образуются две молекулы H_2O и две молекулы АТФ. Для максимальной активности требуется очень низкая концентрация O_2 (10^{-7} М) [160]. Предполагается, что цитохром а и «видимая» медь в этом процессе могут служить резервом электронов либо обеспечивают быстрое восстановление интермедиатов цитохромоксидазы [156, 157]. Восстановленная форма «невидимой» меди показана для мозга *in situ* [313].

Таким образом, на сегодняшний день представляется возможным понять некоторые «тайны» лимитирующей стадии процесса окислительного фосфорилирования и дыхания. Тем не менее вопрос еще далек от своего окончательного решения. Остается, например, неясным, какую роль в этом процессе играет генерация трансмембранного электрохимического потенциала, связанная с работой цитохромоксидазы [410, 590]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что дыхание прямо коррелирует с изменениями свободной энергии синтеза АТФ, а между трансмембранным электрическим потенциалом, рН-градиентом или общей «протондвижущей» силой ($\Delta\mu_H^+$) и скоростью дыхания корреляций нет. Термодинамический анализ подтверждает также, что протонный электрический градиент не может служить первичным интермедиатом в окислительном фосфорилировании [290]. Остается неясным и ряд моментов, касающихся регулирования процесса дыхания в прижизненных условиях.

Фактический материал, касающийся механизма работы цитохромоксидазы, получен в условиях, существенно отличающихся от физиологических, т. е. в которых клетка находится *in vivo*. Это прежде всего касается температурного режима, влияние которого может сказываться как на промежуточных продуктах реакции, так и на характере всего процесса в целом. Известно, например, что при температуре 22–25° С (режим работы Уилсона с клетками) бывают подавлены многие метаболические реакции, которые тем или иным образом могут влиять на тканевое дыхание (активность процессов микросомального окисления, электрогенная функция в нервной клетке и пр.). С температурным режимом может быть связана иная, как правило, значительно большая степень восстановленности цитохромов дыхательной цепи, наблюдаемая *in vivo*.

Изменение соотношения окисленности—восстановленности дыхательных переносчиков, в свою очередь, может повлечь за собой серьезные перестройки в регулировании клеточным дыханием. Известно, например, что при ишемии в условиях *in vivo* концентрация АТФ в головном мозге не меняется до очень низких значений PO_2 [89, 199], что противоречит рассмотренным в этом разделе данным Эречинской и сотрудников. Термодинамическая модель окислительного фосфорилирования не учитывает также возможность трансформации активности различных участков дыхательной цепи по ходу деятельности. Однако ниже показано, что это может иметь место. Например, при снижении PO_2 НАД-зависимый путь поступления восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь подавляется на фоне активации сукцинатоксидазного пути окисления.

Все изложенное свидетельствует о том, что требуются дальнейшие серьезные исследования особенностей регулирования дыхания и процесса энергообеспечения в интактной клетке.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В ИНТАКТНЫХ КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ

Из рассмотренного выше материала следует, что для понимания закономерностей регуляции процесса окислительного фосфорилирования и клеточного дыхания принципиальное значение имеет оценка состояния дыхательной цепи митохондрий в клетке, включающая сведения о

редокс-состоянии дыхательных переносчиков и интенсивности потребления кислорода, а также о фосфорилирующем состоянии адениннуклеотидного пула цитозоля. Однако измерения последнего представляет собой достаточно трудоемкую процедуру, исключаящую возможность описания быстрых динамических изменений, происходящих в окислительном метаболизме клетки в процессе ее работы и получения сведений о метаболическом потоке через дыхательную цепь. В то же время при изучении функции органа часто бывает необходимым знание не только энергетического состояния системы, основанного на измерении концентрационных соотношений метаболитов, но и мощностей метаболических потоков, обеспечивающих ее стабильность в широком диапазоне физиологических нагрузок. В связи с этим становятся особенно важными прижизненные кинетические измерения состояния дыхания и дыхательных переносчиков в интактных клетках и тканях с помощью оптических и полярографических методов. Начатые Чансом [137, 146–151], эти исследования были успешно продолжены многими другими исследователями [21–23, 49, 162, 167, 253, 312, 381, 432, 498, 565, 566] и составляют на сегодняшний день самостоятельное направление, находящееся на стыке физиологии, биохимии и биофизики. Результаты такого рода исследований устанавливают корреляции между функцией и окислительным метаболизмом. Некоторые из них были проанализированы в предыдущих разделах данной главы.

В целой серии работ, проведенных на перфузируемых органах, Чанс и соавторы [158, 167, 498] показали, что большим методическим подспорьем при решении такого рода задач является ингибиторный анализ, широко применяемый в исследованиях на изолированных митохондриях. Он открывает возможность для оценки относительного вклада и роли того или иного пути окисления для данного физиологического состояния. Учитывая, что изолированные клетки и ткани сохраняют многие специфические черты обмена, характерные для интактных тканей (см. приложение), такой прием становится неоценимым при исследовании особенностей окислительного метаболизма органов *in situ*, а также изолированных тканей.

Оценка состояния НАД-зависимого участка дыхательной цепи в клетках и тканях. В отличие от изолированных митохондрий в интактных клетках и тканевых препаратах имеется достаточное количество эндогенных субстратов, а

Таблица 9. Влияние переживания на различные параметры дыхания срезов мозга, миокарда и печени мышей (рН 7,4) (данные получены в закрытой полярнографической ячейке)

Субстрат	Скорость дыхания, ммоль O ₂ мин ⁻¹ мг ⁻¹		Дыхательный контроль суб- стратов, % к эн- догенному дыха- нию		Амплитуды- тельное дыхание, % (10-3 M)		ЦРД (10-3 M), %	
	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин
Мозг, 37°								
Эндогенный	1,3±0,09	0,37±0,06	1,0	1,0	35	63	36	2
Глюкоза	1,5±0,5	0,84±0,1	1,2	2,0	27	34	3	8
Пируват	1,8±0,4	0,92±0,1	1,4	1,5	100	92	15	0
Глутамат	1,7±0,5	0,74±0,1	1,3	2,2	61	85	4	4
α-кетоглутарат	2,2±0,5	1,32±0,3	1,7	2,1	54	70	48	53
Сукцинат	1,5±0,3	1,02±0,2	1,2	2,3	19	24	8	11
НАДН	2,0±0,5	0,70±0,7	1,5	1,7	33	40	16	2
НАДФН	—	0,51±0,2	—	—	30	53	55	—
α-глицерофосфат	0,91±0,25	0,90±0,4	—	—	—	—	—	—
Мозг, 20°								
Эндогенный	1,3±0,3	0,9±0,2	1,0	1,0	84	74	0	0
Глутамат	2,6±0,4	1,2±0,3	2,0	1,3	60	62	9	15
α-кетоглутарат	3,9±0,4	3,2±0,6	3,0	3,5	71	50	38	48
Сукцинат	1,6±0,2	1,5±0,2	1,2	1,7	24	41	0	0
НАДН	2,6±0,5	1,2±0,2	2,0	1,3	81	53	0	0

Таблица 9 (продолжение)

Таблица 9 (продолжение)

Субстрат	Скорость дыхания, ммоль O_2 мин ⁻¹ мг ⁻¹		Дыхательный контроль субстратов, % к эндогенному дыханию		Амплитуды-тельное дыхание, % (10 ⁻³ M)		ЦРД (10 ⁻³ M), %	
	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин
<i>Миокард, 37°</i>								
Эндогенный	0,59±0,05	0,28±0,02	1,0	1,0	57	60	41	75
Глюкоза	0,70±0,08	0,41±0,06	1,2	1,3	65	26	—	—
Пируват	0,45±0,04	0,34±0,04	0,9	0,9	50	49	38	40
Глутамат	0,75±0,03	0,70±0,05	0,9	1,7	46	50	40	48
α-кетоглутарат	0,64±0,03	0,66±0,09	0,95	2,6	50	36	60	61
Сукцинат	1,62±0,2	1,55±0,11	2,9	4,4	51	31	10	14
НАДН	1,0±0,3	0,95±0,12	1,5	3,1	40	28	64	83
<i>Миокард, 20°</i>								
Эндогенный	0,6±0,1	0,4±0,08	1,0	1,0	62	100	70	30
Пируват	1,3±0,3	0,7±0,1	2,1	1,8	44	37	47	16
Глутамат	0,7±0,1	1,2±0,3	1,2	3,0	48	36	0	0
α-кетоглутарат	1,8±0,3	2,0±0,4	3,0	5,0	26	8	70	75
Сукцинат	1,7±0,3	2,0±0,4	2,8	5,0	22	21	0	7
НАДН	1,0±0,2	1,5±0,3	1,7	3,7	50	34	22	0

Субстрат	Скорость дыхания, нмоль O ₂ мин ⁻¹ мг ⁻¹		Дыхательный контроль суб- стратов, % к эн- дотенному дыха- нию		Амитацнувствн- тельное дышанне, % (10 ⁻³ M)		ЦРД (10 ⁻³ M), %	
	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин	5 мин	60 мин
<i>Печень, 37°</i>								
Эндотенный	0,85±0,09	0,55±0,05	1,0	1,0	64	51	12	31
Глюкоза	0,96±0,14	0,50±0,07	1,1	1,1	24	53	-	-
Пируват	1,00±0,15	0,6±0,09	1,2	1,3	13	63	14	15
Глутамат	1,70±0,2	0,80±0,05	2,1	1,6	65	84	100	46
α-кетоглутарат	1,90±0,2	1,50±0,5	2,3	3,0	65	38	21	44
Сукцинат	1,80±0,4	1,4±0,1	2,5	3,1	44	49	17	2
НАДН	1,65±0,3	1,2±0,2	1,96	2,9	71	69	50	62
НАДФН	1,1	0,84±0,1	1,2	1,5	55	37	-	100
<i>Печень, 20°</i>								
Эндотенный	0,94±0,2	0,8±0,1	1,0	1,0	39	23	10	28
Пируват	1,13±0,1	1,12±0,2	1,2	1,4	45	42	39	50
Глутамат	1,8±0,4	1,3±0,2	1,90	1,6	45	20	-	-
α-кетоглутарат	1,4±0,2	1,7±0,3	1,50	2,1	41	54	-	-
Сукцинат	2,8±0,5	5,3±0,8	3,0	6,6	24	14	2	22
НАДН	1,2±0,1	2,3±0,4	1,3	2,9	37	39	8	35
<i>Прнмечанне. Концентрация субстратов: глюкоза, пируват, гл утамат, α-кетоглутарат, сукцинат, α-глицерофосфат — 10 мм; НАДН и НАДФН — 1 мм.</i>								

Примечание. Концентрация субстратов: глюкоза, пируват, гл утамат, α -кетоглутарат, сукцинат, α -глицерофосфат — 10 mM ; НАДН и НАДФН — 1 mM .

также АДФ и Φ_n , которые обеспечивают сравнительно высокие скорости дыхания при физиологически адекватных условиях их инкубирования. Тем не менее экзогенные субстраты специфически изменяют ориентацию метаболизма. Например, НАД-зависимые субстраты активируют дыхание различных тканей (табл. 9) и в их присутствии происходит увеличение степени восстановленности пиридинового пула клетки [45, 48, 56, 565, 566] (рис. 18).

Ингибиторы окисления НАДН и НАД-зависимых субстратов (пирувата, глутамата, α -кетоглутарата) амитал и ротенон подавляют дыхание клеток, тканей и перфузируемых органов, восстанавливают пиридиннуклеотиды, окисляют (или восстанавливают) флавины и окисляют цитохромы дыхательной цепи [48, 49, 167, 498, 565, 566]. Количественно эффект этих ингибиторов зависит от субстрата окисления. Он наиболее выражен на фоне окисления НАД-зависимых субстратов и слабо проявляется в присутствии, например, сукцината (см. табл. 9) (рис. 19). Эффект развивается в течение 5–10 мин, что связано со сравнительно медленной проницаемостью амитала через гистогематические барьеры препарата.

Концентрации, необходимые для полумаксимального ингибирования дыхания клеточных препаратов, несколько отличаются для разных тканей, они равны приблизительно 10^{-3} M (см. приложение). С увеличением дозы амитала усиливаются эффект ингибирования и степень восстановленности пиридиннуклеотидов (см. рис. 19). Однако при концентрациях амитала $4 \cdot 10^{-3}$ – $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ наблю-

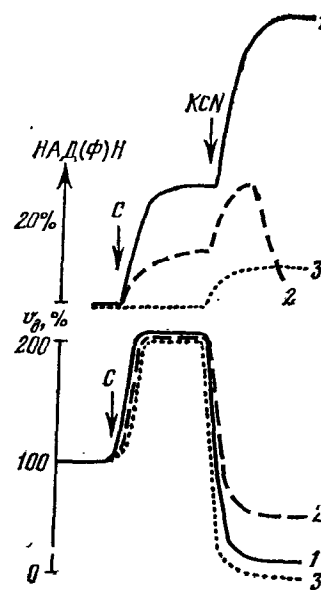


Рис. 18. Сравнительное действие различных субстратов на восстановление НАД(Ф) в срезах мозга (60 мин)

1 — сукцинат; 2 — α -кетоглутарат; 3 — глюкоза; C — внесение субстрата (10^{-2} M); KCN — внесение KCN (10^{-3} M)

соответствующим изменениям степени восстановленности дыхательных переносчиков в НАД-зависимом участке дыхательной цепи. Это свойство было использовано нами для выявления новых ингибиторов НАД-зависимого окисления на тканевых срезах (см. приложение).

Из табл. 9 видно, что чувствительность дыхания тканевых препаратов к амиталу не является стабильной величиной. Она меняется в зависимости от возраста срезов, температуры инкубации, типа ткани, субстрата окисления. Наибольших значений (при $t=37^{\circ}\text{C}$) эта чувствительность достигает в срезах мозга (60 мин после экстирпации) и при окислении НАД-зависимых субстратов (пирувата, глутамата, α -кетоглутарата). Чувствительность дыхания к амиталу резко уменьшается при окислении сукцината, что свидетельствует о снижении объема НАД-зависимого окисления в этом случае. Миокард желудочка сердца характеризуется значительно меньшим объемом НАД-зависимого окисления сравнительно с мозгом: амиталчувствительное дыхание не превышает ни в одном случае 60%. Близкие к нему значения показаны для печени. Таким образом, анализ амиталчувствительной компоненты дыхания в тканевых препаратах позволяет получить информацию об относительном вкладе НАД-зависимого окисления для данной ткани и данного конкретного физиологического и метаболического состояния.

В присутствии амитала на тканевых препаратах удается регистрировать изменения, касающиеся не только митохондриального пула пиридиннуклеотидов, но и вклада цитозольного пула в пиридинзависимые реакции. Амитал, как известно, прерывая поток электронов в НАД-зависимом участке дыхательной цепи, усиливает гликолитическую активность [158, 167, 427, 498], в том числе и образование лактата из пирувата. В связи с этим на фоне действия амитала может регистрироваться окисление НАД(Ф)Н, связанное уже не с митохондриальным, а цитозольным пулом. Это демонстрируется на рис. 21, из которого видно, что на фоне окисления глюкозы срезами мозга амитал может приводить не к восстановлению НАД(Ф)Н, а его окислению, чего не наблюдается в присутствии мала-та. Таким образом, исследование действия амитала на НАД-зависимый участок окисления дает информацию о направлении метаболического потока в клетке.

Активность сукцинатоксидазного пути окисления в клетках и тканях. Хорошо известно, что при окислении

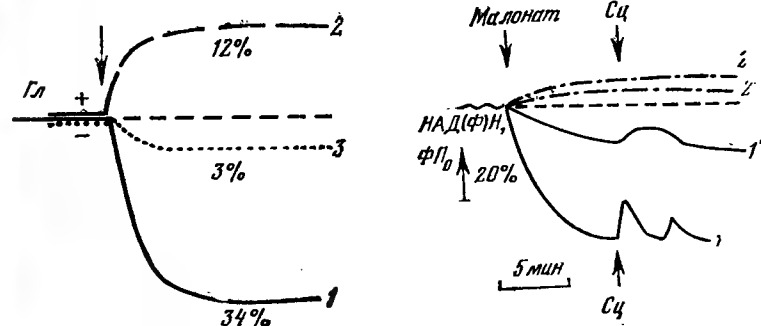


Рис. 21. Действие амитала (стрелка) на дыхание (1), люминесценцию НАД(Ф)Н (2) и Ф/О (3) в срезах мозга при окислении глюкозы

Рис. 22. Действие малоната ($5 \cdot 10^{-2}$ М) на люминесценцию НАД(Ф)Н (1 и 1') и Ф/О (2 и 2') в срезах коры головного мозга через 5 (1 и 2) и 60 (1' и 2') мин после экстирпации ткани

сукцината, сопровождающегося стимуляцией дыхания, наблюдается сильное восстановление пиридиннуклеотидов в изолированных митохондриях, что связывается с обратным транспортом электронов [352]. То же самое показано для асцитных клеток [146—148], возбужденной мышцы и срезов самых различных тканей [48, 167, 566] (см. рис. 18). Во всех случаях сукцинат восстанавливает НАД(Ф)Н значительно более интенсивно по сравнению с другими субстратами. Это восстановление не происходит в присутствии малоната — конкурентного ингибитора сукцинатдегидрогеназы (рис. 22), а также значительно уменьшается, как указывалось выше, в присутствии амитала (см. рис. 20) [566]. Восстановление же цитохромов дыхательной цепи не зависит от того, окисляется ли сукцинат в присутствии амитала или нет [566]. Таким образом, амитал не нарушает поток электронов от сукцината к цитохромоксидазе, а лишь частично ингибирует восстановление пиридиннуклеотидов.

Малонат вызывает резкое окисление пиридиннуклеотидов, которое впервые было замечено на срезах печени Ван Россумом [566], и воспроизводится также на срезах нервной ткани (см. рис. 22) [48]. Оно наблюдается при окислении сукцината и эндогенных субстратов, но не НАД-зависимых субстратов. Так как амитал, добавленный после малоната, восстанавливает пиридиннуклеотиды так же, как и без малоната, а последний не эффективен, если

он добавлен после амиталя [565], следует вывод, что его действие не связано с подавлением окисления НАД-зависимых субстратов, но реализуется через амиталрезистентный путь. Имеется две возможности для объяснения эффекта: 1) либо в присутствии малоната происходит окисление α -кетоглутарата благодаря НАД-зависимой реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой [565]; 2) либо он связан с подавлением окисления сукцината, поддерживающего дыхательную цепь в восстановленном состоянии благодаря обратному переносу электронов [565, 566].

Терминальный участок дыхательной цепи клеток и тканей. Ингибиторами терминальной оксидазы дыхательной цепи митохондрий являются цианиды, азид натрия, сульфид натрия, СО. В срезах, клетках и перфузируемых органах они подавляют дыхание, активный транспорт ионов и восстанавливают остальные переносчики дыхательной цепи [158, 167, 493—498]. Их эффект сходен с действием аноксии. Однако даже при высоких концентрациях ингибиторов в клетках и тканях трудно получить полное подавление дыхания. Так как в митохондриях тканей млекопитающих (в отличие от дрожжей, бактерий, грибов и растений) активностью альтернативной основной дыхательной цепи оксидазы, чувствительной к производным гидрооксисоединения, не выявлена, наличие ЦРД в тканях и клетках связывается с немитохондриальными кислородзависимыми процессами [2, 498]. Из табл. 9 видно, что величина ЦРД зависит от окисляемого субстрата.

В часовых срезах печени ЦРД (при 37°С) колеблется от 2% (сукцинат) до 100% (НАДФН). Можно предполагать, что в первом случае практически все дыхание связано с активностью дыхательной цепи, в то время как во втором терминальный участок дыхательной цепи, видимо, вообще не включается в окисление. Так как около 40% дыхания оказывается амиталчувствительным (см. табл. 9), очевидно, что до 60% общего тканевого дыхания в этом случае связано с немитохондриальным окислением. Экзогенный НАДН также может окисляться срезами печени, при этом регистрируются 2—3-кратная стимуляция дыхания и высокая чувствительность к амиталу. Однако доля немитохондриального окисления при этом составляет около 40%. Низкая чувствительность к КСН в присутствии глутамата и α -кетоглутарата свидетельствует о том, что оба субстрата обеспечивают активность альтернативных дыхательной цепи кислородзависимых процессов.

В мозге ЦРД (при 37°С) колеблется от 2 до 50% (см. табл. 9). Самые низкие его значения наблюдаются при окислении сукцината, НАДН, глутамата, пирувата и глюкозы. Так как дыхание в присутствии НАД-зависимых субстратов в срезах мозга отличается еще и высокой чувствительностью к амиталу, который ингибирует его на 70—90%, очевидно, в этом случае оно почти полностью поддерживается за счет высокой кативности НАДН-оксидазного участка дыхательной цепи. Немитохондриальное дыхание выражено слабо. Иное имеет место при окислении глюкозы, которая, как известно, в мозге *in vivo* на 90% окисляется аэробным путем через пируват и цикл ЦТК. Однако дыхание срезов мозга, окисляющих глюкозу, характеризуется высокой чувствительностью к цианиду и низкой — к амиталу. Это позволяет думать, что часть восстановительных эквивалентов поступает в дыхательную цепь через амиталнечувствительный путь, возможно через α -глицерофосфатный шунт, который в мозге очень активен. То же самое происходит при окислении экзогенного НАДН. Наименее высокие значения ЦРД, как и в печени, характеризуют окисление α -кетоглутарата.

В срезах миокарда ЦРД (при 37°С) при окислении разных субстратов значительно выше, чем в других тканях (см. табл. 9). Исключение составляет сукцинат (ЦРД=14%). Во всех остальных случаях оно равно 40—80%. Следовательно, в миокарде немитохондриальные процессы вносят, видимо, очень существенный вклад в тканевое дыхание.

Обращает на себя внимание, что на фоне окисления сукцината чувствительность дыхания к ингибитору терминального участка дыхательной цепи всегда очень высока в самых разных тканях, т. е. интенсификация дыхания, наблюдаемая в этом случае, отражает высокую актив-

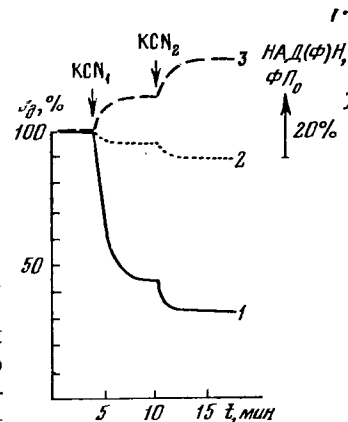


Рис. 23. Действие KCN_1 (10^{-3} М) и KCN_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ М) на дыхание (1), люминесценцию НАД(Ф)Н (2) и Φ_{H_2} (3) в срезах мозга

ность сукцинатоксидазного участка дыхательной цепи и сопровождается сокращением вклада в тканевое дыхание альтернативных кислородзависимых путей окисления в клетке.

Из всех этих данных следует, что соотношение митохондриальных и немитохондриальных процессов окисления — величина очень лабильная, зависящая от функционального и метаболического состояния препаратов. Существенное значение при этом имеет состояние самой дыхательной цепи, отдельных ее звеньев. Так, уже отмечалась высокая чувствительность дыхания к KCN в срезах мозга в случае окисления глюкозы. Однако, если перед этим поток электронов от НАД-зависимого участка был заингибирован (добавлен амитал), ЦРД, как показано ниже, резко увеличивалось (в 6 раз):

Субстрат	ЦРД, %
Глюкоза (1 мМ) + KCN (1 мМ)	8
[Глюкоза (1 мМ) + амитал (1 мМ)] + KCN (1 мМ)	50
Сукцинат (10 мМ) + KCN (1 мМ)	14
[Сукцинат (10 мМ) + амитал (1 мМ)] + KCN (1 мМ)	12

Таким образом, ограничение НАД-зависимого окисления увеличивает компоненту дыхания, не чувствительную к цианиду. Этот эффект отсутствует, если субстратом окисления является сукцинат.

В присутствии ингибиторов терминального участка дыхательной цепи происходит восстановление дыхательных переносчиков, в том числе флавинов и пиридинов, если НАД-зависимый участок не был заблокирован амитаом или ротеноном (рис. 23). Эффект нарастает с увеличением концентрации ингибитора и насыщается при дозе KCN $(3-5) \cdot 10^{-3}$ М.

Таким образом, использование ингибиторного анализа на тканевых препаратах позволяет выявлять состояние того или иного участка дыхательной цепи, его относительную активность (интенсивность метаболического потока) в данном функциональном состоянии. Мы уже отмечали, что ингибиторный анализ с успехом применяется для аналогичных целей на перфузируемых органах [158, 167, 187, 498].

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В ТКАНЕВЫХ ПРЕПАРАТАХ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

Влияние переживания на показатели окислительного метаболизма ткани. Эмпирически давно уже установлено, что при работе с перфузируемыми органами [120, 158, 167, 225, 266, 493, 496—498], нервно-мышечным препаратом [124, 122, 162, 187, 307—310], срезами [204, 393, 394, 565, 566, 584] и изолированными клетками [287, 339—342, 504, 505] необходима достаточно длительная преинкубация, прежде чем будет достигнут стационарный режим работы. Это связано с изменением функционально-метаболических свойств изолированных препаратов. Впервые зависимость действия ингибиторов дыхания и гликолиза от времени инкубации гомогената была показана более 30 лет тому назад. Впоследствии были установлены резкое уменьшение количества креатинфосфата и АТФ и накопление АДФ и неорганического фосфата в свежеизолированных срезах мозга с последующей относительной нормализацией энергетического состояния ткани [393, 394]. Показано нарушение ионного равновесия после экстирпации в срезах печени [187, 188, 204, 206, 375]. Восстановление стационарного состояния при 38° в срезах печени достигается через 30—45 мин [206].

Нами также было показано, что окислительно-восстановительные и метаболические свойства, связанные с работой дыхательной цепи тканевых срезов и изолированных клеток, меняются в процессе переживания [29, 45, 48, 49]. Свежеизолированные срезы различных тканей обладают более высокой эндогенной скоростью дыхания, чем в последующие периоды. Экзогенные субстраты, как правило, стимулируют ее в значительно меньшей степени (либо вообще не оказывают действия), нежели в более поздний период (см. табл. 9) [45, 48, 49]. Таким препаратам свойственна очень высокая степень восстановленности пиридинового пула (рис. 24) и относительно слабая стимуляция дыхания сукцинатом, нежели в более поздние сроки переживания. При этом восстановления пиридиннуклеотидов, характерного для сукцината, не происходит либо даже может иметь место их окисление (рис. 25). Пируват также окисляет пиридиннуклеотиды, что может быть связано с его превращением в лактат в цитозоле [167, 470], хотя

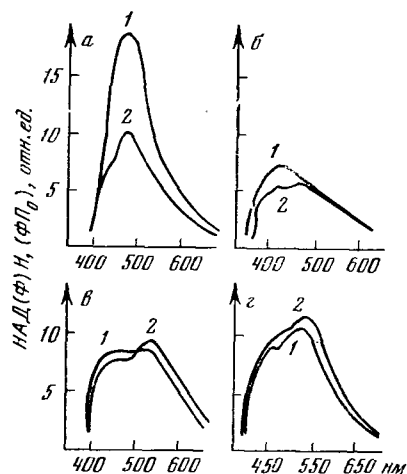


Рис. 24. Изменение спектров люминесценции НАД(Ф)Н (1) и флавопротеидов (2) в срезах коры головного мозга после экстирпации а — через 15—30 мин; б — через 60—70 мин; в — 1,5—2 ч; г — через 3 ч

Рис. 25. Изменение люминесценции НАД(Ф)Н (1) и флавопротеидов (2) в различных метаболических состояниях в срезах коры головного мозга через 5 (а) и 60 мин (б) после экстирпации ткани

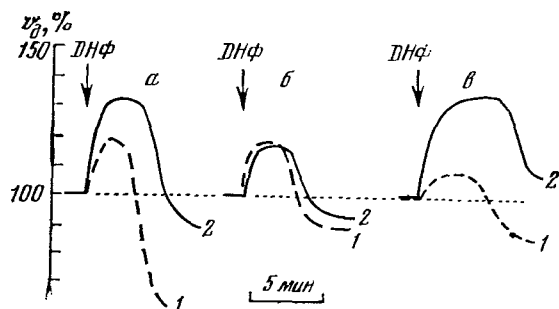
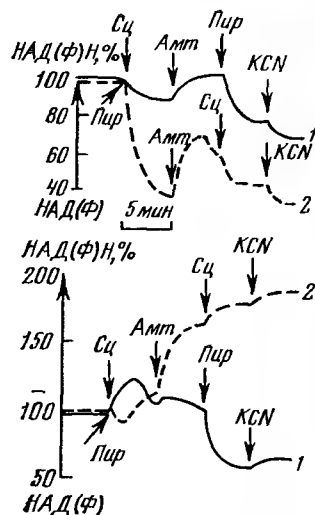


Рис. 26. Действие 2,4-динитрофенола ($5 \cdot 10^{-5}$ М) на изменение интенсивности дыхания срезов мозга после экстирпации при окислении глюкозы (а), сукцината (б) и глутамата (в)

1 — через 5 мин; 2 — через 60 мин; $t = 36,5^\circ \text{C}$



НАД-зависимый путь его окисления в дыхательной цепи, судя по амиталчувствительному дыханию, сохраняется (см. табл. 9). Наряду с этим отмечаются сравнительно низкая чувствительность препаратов к ДНФ (рис. 26) и затрудненность активации дыхания высокими концентрациями KCN, зависящие от усиления $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-азной активности (см. рис. 16). Эти последние два факта свидетельствуют как об ослаблении степени энергизации препаратов в этот период, так и о том, что реализация эндогенических реакций в них затруднена. Эти выводы находятся в полном соответствии с упомянутыми выше данными цикла работ Мак Илвейна на срезах мозга [393, 394], а также с нашими более ранними работами, в которых было показано, что электрическое раздражение срезов в этот период не стимулирует их дыхание [47, 50, 51].

Парадоксальным является то, что дыхательная цепь в свежеизолированных препаратах находится, по-видимому, в высокоактивном состоянии, о чем свидетельствует достаточно высокая чувствительность дыхания срезов к цианидам (см. табл. 9). Большая интенсивность потребления кислорода в них протекает на фоне очень высокой степени восстановленности пиридиннуклеотидов. В процессе переживания происходит снижение интенсивности скорости дыхания и окисление НАД(Ф)Н. Однако между динамикой последнего и кинетикой окисления флавопротеидов нет количественной корреляции. Снижение люминесценции пиридиннуклеотидов срезов происходит очень быстро и уже только за первые 40 мин составляет 40—50%, а за 1,5—2 ч — 60—70%. Изменение люминесценции флавопротеидов за два часа составляет всего 15—20%. Сопоставление всех этих фактов позволяет предполагать, что высокая восстановленность пиридиннуклеотидов, характерная для свежеизолированных срезов, отражает преимущественно состояние немитохондриального пула, который очень быстро окисляется. Дыхательная цепь принимает активное участие в этом процессе, о чем говорит не только большая чувствительность дыхания к ингибиторам терминального участка дыхательной цепи, но и затормаживание или прекращение вообще окисления пиридиннуклеотидов в присутствии амитала или KCN.

Таким образом, одним из возможных путей освобождения цитозоля клетки от перевосстановленности является активация транспорта электронов в дыхательной цепи.

Перенос восстановительных эквивалентов из цитозоля в митохондрии в этот период в срезах мозга и печени происходит преимущественно амиталрезистентным путем (амиталчувствительное дыхание при окислении глюкозы составляет 24 и 27% соответственно). Следовательно, высокая скорость дыхания свежеизолированных срезов и кинетика окисления пиридиннуклеотидов в этот период связаны, видимо, с окислением цитоплазматического НАДН, для которого в этих тканях известны амиталнечувствительные пути поступления его в дыхательную цепь [61, 256, 411а, 565, 566].

Все это позволяет предполагать, что в свежеизолированных тканевых препаратах происходит декомпенсация нормального метаболизма и функции, связанная с экстирпацией, к которой могут добавляться аноксические нарушения. При адекватных условиях инкубирования происходят восстановление и относительная нормализация процессов биологического окисления и сопряженных с ними функциональных параметров ткани, приводящие к восстановлению энергетического статуса клетки. Это и есть тот период, который регистрируется на срезах в первые 30–40 мин после их экстирпации («постгипоксическая активация» [43, 44]).

Через 40–60 мин (быстрее для печени, медленнее для мозга) редокс-показатели препаратов стабилизируются (см. рис. 24) за счет увеличения отношения $[НАД^+]/[НАДН]$. Появляется способность к обратному транспорту электронов при окислении сукцината (см. рис. 25), восстанавливается характерный двухфазный ответ дыхания и окислительно-восстановительных превращений пиридиннуклеотидов в ответ на калиевую нагрузку, свидетельствующий о восстановлении активности $Na^+ - K^+$ -транспортной АТФазы (см. рис. 16). Этот эффект снимается строфантином. В отличие от свежеизолированных срезов на часовых срезах 2,4-динитрофенол способен вызвать двухфазный дыхательный ответ: стимуляцию с последующим ингибированием (см. рис. 26). У возбужденных тканей восстанавливается способность реагировать на электростимуляцию [29, 45, 48, 49]. Все эти изменения происходят на фоне некоторого вторичного увеличения отношения $[АТФ]/[АТФ][Ф_n]$ клетки [393, 394] и изменения активности НАД-зависимого участка дыхательной цепи (см. табл. 9). Таким образом, происходит относительная нормализация метаболических и функциональных параметров ткани.

Данное стационарное состояние поддерживается на протяжении второго часа переживания, после чего происходит постепенная потеря функциональных и метаболических свойств, присущих данному виду ткани в связи со старением препарата [29, 48, 49]. Эту периодичность следует учитывать при использовании тканевых препаратов в качестве биологической модели как для физиологических, так и для биохимических исследований. Она характерна не только для срезов, но и для изолированных клеток [75], а также, как уже говорилось выше, для перфузируемых органов. Исключение составляет органотипическая культура ткани, для которой период поддержания стационарного состояния по показателям окислительного метаболизма в силу более адекватных условий инкубирования может длиться сравнительно долго. «Угасание» функции органотипической культуры тканей происходит в течение 2–3 недель и характеризуется выраженной волнообразностью [47, 51].

Влияние температурного режима на состояние дыхательной цепи тканевых препаратов. Роль температурного фактора в метаболизме и функции изолированных препаратов в настоящее время изучена достаточно основательно и связывается главным образом с изменением активности транспортной АТФазы [204]. Установлено, что резкие отклонения от физиологических температур (до 5–0° С) приводят к нарушению ионного баланса внутри клеток, в частности к выходу интрацеллюлярного K^+ при активном накоплении Na^+ и к внутриклеточной задержке воды, набуханию митохондрий и клеток [121, 122, 204, 453]. Последнее может сопровождаться вначале активацией реакций окисления, а затем в конечном счете приводит к подавлению энергетической функции клетки, а следовательно, и эндогенных реакций, а также многих реакций пластического обмена. При переходе к более низким температурам (20°) часто уменьшается не только стимулирующее действие субстратов окисления, но и знак реакции (см. табл. 9). Для низких температур характерна замедленная утилизация субстратов [51].

Температурный режим сказывается на особенностях работы различных звеньев дыхательной цепи: доля амитал- и цианидчувствительного дыхания срезов при окислении самых различных субстратов в этом случае, как правило, увеличивается (см. табл. 9). Усиливается реакция на динитрофенол. Таким образом, срезы тканей, ви-

димо, отвечают на снижение температуры так же, как и ткани в организме при искусственном охлаждении.

Особенности работы дыхательной цепи при сниженных значениях pO_2 . Выше уже отмечалось, что проведение экспериментов на клеточных и тканевых моделях, а также в условиях *in situ* позволило внести много уточнений в наши представления относительно состояния дыхательных переносчиков при уменьшении pO_2 и кажущейся $K_m(O)$. Наряду с этим в литературе накапливаются данные о возможности изменения соотношения активности различных участков дыхательной цепи и направления метаболических потоков в условиях гипоксии [74, 470]. Это подтверждается и при моделировании последней *in vitro* на тканевых препаратах.

Переход в область низких значений pO_2 сопровождается появлением двух характерных для этого случая особенностей в работе дыхательной цепи: происходит снижение относительной чувствительности дыхания к амиталу, что может рассматриваться как ограничение НАД-зависимого окисления, и активируется окисление сукцината [32, 34, 43, 44, 74]. Вывод об ограничении транспорта электронов через НАД-зависимый участок дыхательной цепи в условиях низкого pO_2 не только основывается на данных об уменьшении чувствительности дыхания к амиталу (рис. 27), но и подтверждается снижением эффективности его действия на восстановление пиридиннуклеотидов, а также уменьшением восстанавливающего НАД-зависимый участок дыхательной цепи действия сукцината (ограничение обратного переноса электронов) (рис. 28).

Этот эффект особенно выражен у неустойчивых к гипоксии животных. Однако, несмотря на это, изменения дыхания срезов мозга и печени у неустойчивых и у устойчивых животных при уменьшении pO_2 одинаковы. Это может быть только в том случае, если у неустойчивых животных в большей степени, чем у устойчивых, активируются метаболические пути, компенсирующие снижение НАД-зависимого окисления. Оказывается, что это действительно так. Дыхание срезов в области низких pO_2 становится значительно более чувствительным к малонату — специфическому ингибитору сукцинатдегидрогеназы.

Возможность преимущественного окисления сукцината изолированными митохондриями в гипоксических условиях известна [74]. Она связывается с активацией сукцинатдегидрогеназы в условиях увеличения восстановлен-

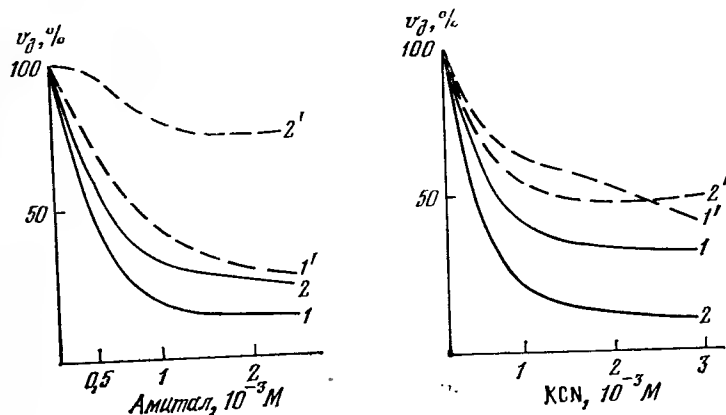


Рис. 27. Изменение чувствительности тканевого дыхания (срезы мозга) к амиталу при различных значениях pO_2

1, 2 — $pO_2 = 160$ мм рт. ст.; 1', 2' — $pO_2 = 20$ мм рт. ст.; 1 и 1' — устойчивые животные; 2 и 2' — неустойчивые животные

Рис. 28. Изменение чувствительности тканевого дыхания (срезы мозга) к KCN при различных значениях pO_2

Объяснение то же, что на рис. 27

ности дыхательных переносчиков на участке НАДН—КоQ. В этих же условиях окисление НАД-зависимых субстратов в изолированных митохондриях затруднено по кинетическим причинам.

Преимущества окисления сукцината срезами мозга и печени демонстрировались выше в связи с анализом зависимости скорости дыхания от pO_2 (см. ниже рис. 30). Наряду с тем что он снижает кажущуюся $K_m(O)$, в его присутствии дыхание поддерживается на более высоком уровне сравнительно с другими субстратами, особенно в области 50—30 мм рт. ст. (дыхательный контроль для сукцината при pO_2 159 мм рт. ст. для печени равен 1,9 и для мозга — 1,4; при гипоксии — 2,9 и 1,9 соответственно). Увеличение эффективности окисления сукцината может быть косвенным доказательством повышения активности сукцинатдегидрогеназы. Однако способность сукцината восстанавливать пиридиннуклеотиды уменьшается. Это объясняется двумя причинами: наблюдаемым блоком амиталчувствительного пути восстановления пиридиннуклео-

тидов и снижением степени энергизации препаратов в этих условиях.

Целью активации окисления сукцината при гипоксии является компенсаторное поддержание активности дыхательной цепи, ее энергетической функции. В силу высокой скорости переноса электронов в этом случае компенсируется потеря первого пункта фосфорилирования. В условиях ограничения окисления НАД-зависимых субстратов компенсаторная активация окисления сукцината оксидазного пути окисления не может существенно влиять на восстановление энергезависимого пула митохондриальных пиридиннуклеотидов. Активация сукцината оксидазного пути окисления в тканях при снижении pO_2 является защитно-компенсаторной реакцией неадаптированных к гипоксии клеток. Однако, так как этот путь в норме сильнее развит у неустойчивых к гипоксии животных и его активность в ответ на снижение pO_2 происходит одинаково в обеих группах животных, степень его активности не может связываться с индивидуальной устойчивостью клетки к гипоксии. Эту реакцию следует рассматривать скорее как неспецифическую защитную реакцию на стрессовый раздражитель. Действительно, в процессе адаптации животных к гипоксии эта реакция перестает играть существенную роль. Более того, в тканях адаптированных животных происходит восстановление НАД-зависимого окисления, которое перестает быть чувствительным к низким значениям pO_2 .

Имеется еще одна особенность реакции ткани на гипоксию. При уменьшении pO_2 меняется чувствительность тканевого дыхания к ингибиторам терминального участка дыхательной цепи (рис. 29). У нормальных животных существуют выраженные индивидуальные различия в реакции тканевого дыхания на цианиды. ЦРД устойчивых к гипоксии животных значительно больше, чем у неустойчивых. При уменьшении pO_2 оно резко возрастает в обеих группах, но у неустойчивых больше, чем у устойчивых.

Если рассматривать ЦРД как вклад немитохондриальных кислородзависимых и цианиднечувствительных процессов, то очевидно, что у устойчивых животных объем таких реакций существенно больше, чем у неустойчивых. При адаптации он увеличивается в обеих группах, но у неустойчивых остается значительно меньше, чем у устойчивых. Следует отметить, что при этом увеличивается и

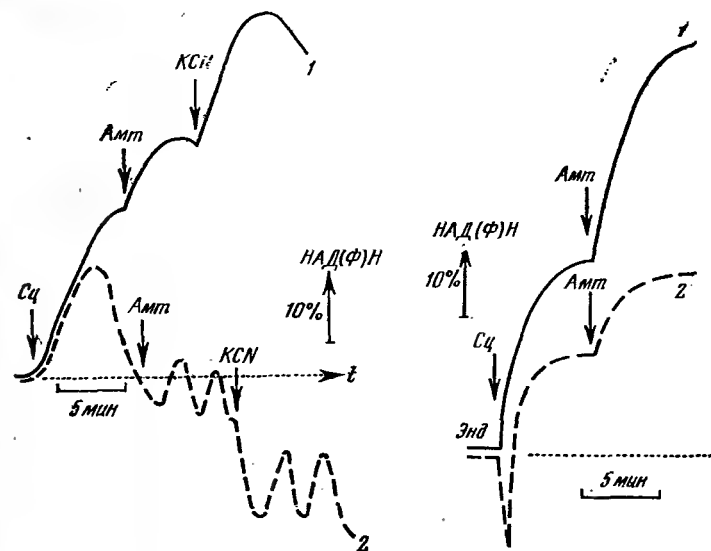


Рис. 29. Изменение направления реакции (степень восстановленности НАД(Ф)Н у «истощенных» срезов (2) сравнительно с контролем (1) (глюкоза)

Рис. 30. Изменение динамики восстановления НАД(Ф)Н при окислении сукцината

1 — $pO_2 = 160$ мм рт. ст.; 2 — $pO_2 = 20$ мм рт. ст.

количество микросомального белка в клетке, а также ее окислительные свойства. Создается впечатление, что в цитозоле клеток существует система, акцептирующая восстановительные эквиваленты, ее активность выше у устойчивых к гипоксии животных, а мощность усиливается в результате адаптации животных к гипоксии. Таким образом, ответная реакция клетки на изменения pO_2 во внешней среде включает трансформацию активности различных участков дыхательной цепи.

Взаимодействие митохондриального окисления с другими внутриклеточными пулами. В клетке должно существовать тесное взаимодействие между митохондриями и другими окислительными системами. Прямое доказательство этому было получено на асцитных клетках [340–342] с помощью микрофлуориметра, позволившего наблюдать изменение степени восстановленности пиридиннуклеотидов в различных внутриклеточных компартментах. Окисление различных субстратов сопровождалось

восстановлением их как в цитозоле, так и в митохондриях. Но степень этих изменений была различна.

Экзогенные субстраты ЦТК приводили к преимущественному восстановлению митохондриального пула, в то время как субстраты гликолиза — к восстановлению цитозольного пула и ядра клетки. Степень выраженности ответа зависела от исходного состояния. У истощенных клеток изменения в митохондриях в первом случае были более сильными.

После инкубации с глюкозой ответ митохондрий практически подавлялся, и усиливалось немитохондриальное восстановление. Амита́л резко угнетал восстановление дыхательных переносчиков при окислении таких субстратов, как глутамат, и способствовал появлению осциллиций флуоресценции. В связи с этим Козн и соавторы пришли к заключению, что отношение $\text{НАД(Ф)H}_{\text{цитоз}}/\text{НАД(Ф)}^+_{\text{митох}}$ может быть использовано для выражения метаболического состояния клеток.

В физиологических условиях и при наличии источников энергии поток восстановительных эквивалентов может идти в двух направлениях. При окислении этанола, лактата, а также в свежеизолированных срезах различных тканей (постгипоксическая активация) поток направлен из цитозоля в митохондрии. В случае глюконеогенеза, а также при окислении жирных кислот появляется возможность поступления восстановительных эквивалентов из цитозоля в митохондрии. В случае глюконеогенеза, а окислении сукцината. Если срезы преинкубировались с глюкозой, окисление сукцината сопровождается восстановлением как пиридиннуклеотидов, так и флавинов. В истощенных срезах (преинкубация без глюкозы) срезы отвечают на добавление сукцината сильной стимуляцией дыхания, однако восстановление пиридиннуклеотидов значительно меньше и ему может предшествовать фаза окисления (рис. 30). После достижения максимальной восстановленности пиридиннуклеотидов может наблюдаться вторичное их окисление. Это рассматривается как отток восстановительных эквивалентов, образуемых при окислении сукцината в дыхательной цепи, и их последующего там окисления.

В физиологических условиях обмен восстановительными эквивалентами обеспечивается челночными механизмами, специфичными для различных тканей. Это имеет очень большое значение для поддержания нормального функцио-

нирования органа. Так, известно, что регулятором силы сокращения сердечной мышцы является система креатинфосфата. Благодаря осуществлению креатинфосфатного пути транспорта энергии поддерживаются стационарный уровень и эффективность сердечной сократительной деятельности и определяется скорость поступления Ca^{2+} через плазматическую мембрану [69]. Забуференность высокоэнергетическими компонентами объясняет постоянную скорость потребления кислорода, которая не меняется во время систолы и диастолы [266]. Несмотря на это, обеспечение дыхательной цепи сердечной мышцы субстратами окисления или восстановительными эквивалентами имеет принципиальное значение. Окислительный метаболизм сердца связан главным образом, с превращениями жирных кислот и гликолизом [94, 484]. Важность непрерывного образования пирувата делает необходимым удаление из цитозоля НАДН, генерируемого на триозофосфатдегидрогеназном уровне. Сердцу свойственна очень высокая скорость окисления НАДН в митохондриях, принудительно связанная с образованием высокоэнергетических интермедиатов [94]. Перенос восстановительных эквивалентов обеспечивается с помощью глицерофосфатного и малатаспарататного шунтов. Наряду с этим на наружной мембране митохондрий предполагается наличие НАДН-оксидазы, окисляющей НАДН цитозоля по нефосфорилируемому пути [470].

Это хорошо согласуется с рассмотренными уже примерами на срезах, свидетельствующими о возможности окисления экзогенного НАДН в свежеизолированной сердечной мышце по цианидрезистентному пути. Из табл. 9 видно, что в свежеизолированных срезах миокарда (при 37°C) дыхание, стимулированное экзогенным НАДН, на 50% чувствительно к амиталу и лишь на 36% — к цианиду. В процессе переживания ткани амиталчувствительность резко уменьшается (до 20%). Однако стимуляция дыхания экзогенным НАДН остается высокой. Все это не только свидетельствует в пользу изменения пути поступления НАДН в дыхательную цепь, но и говорит об определенной независимости его окисления от терминального участка дыхательной цепи.

Цианидчувствительное и амитал- и антимициннечувствительное окисление НАДН показаны для митохондрий печени [411a]. Оно может наблюдаться при холодовом стрессе и осуществляется через НАДН — цитохром b_L ре-

дуктазу. В отличие от этого для срезов печени показана возможность окисления экзогенного НАДН по амиталчувствительному и цианидрезистентному пути (см. табл. 9), которая, как и для сердечной ткани, особенно выражена в период «постгипоксической активации».

* * *

3. КИСЛОРОДЗАВИСИМАЯ СИСТЕМА МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КЛЕТКЕ

канцерогенеза. Итак, метаболизм ксенобиотиков нельзя сводить к детоксикации или инактивации их в организме.

Процессы окисления ксенобиотиков протекают у животных и человека в две последовательные стадии: I—биотрансформация, или преконъюгация, и II—конъюгация [591]. Обе они реализуются благодаря реакциям окисления, восстановления и гидролиза. На первой из них, как правило, химическая структура ксенобиотиков модифицируется таким образом, что функциональные группы, необходимые для конъюгации, становятся доступными для этой реакции.

На субклеточном уровне биотрансформация ксенобиотиков локализована в различных клеточных органеллах и компартментах, главным образом в эндоплазматическом ретикулеуме паренхиматозных клеток, а также в митохондриях и цитозоле (табл. 10). Активность этого процесса в печени выражена гораздо сильнее сравнительно с другими тканями, обладающими такими же свойствами (легкие, почки, малый желудочек, кожа).

МИКРОСОМАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНЫЙ КОМПЛЕКС

Электронтранспортная система эндоплазматического ретикулума большинства тканей, и в первую очередь печени, представляет собой мультикомпонентную систему, организованную в белково-липидный комплекс. Белковая фракция, составляющая до 50% всего белкового материала микросом, состоит по крайней мере из двух гемопротеидов (цитохромов В₅ и Р-450) и трех флавопротеидов. Липидная фракция на 90% представлена мембраносвязанными фосфолипидами, среди которых главная роль принадлежит фосфатидилхолину [296]. В настоящее время нет сомнений, что эта фракция является функциональным компонентом микросомальной системы окисления, изменение состава и свойств которой определяют изменения кинетических параметров метаболизма субстратов независимо от их липофильных свойств [52, 269]. Каталитические свойства переносчиков дыхательной цепи эндоплазматического ретикулума и определяющая роль гидрофобных липид — белок взаимодействий между микросомальными фосфолипидами и ферментами этой цепи с исчерпывающей полнотой изложены в ряде монографий и в других специальных изданиях [2, 52, 105, 399, 400, 447].

Таблица 10. Субклеточная локализация процессов, связанных с метаболизмом ксенобиотиков в печени [241]

Органелла	Тип реакции			конъюгации
	окисление	восстановление	гидролиз	
Эндоплазматический ретикулум	Ароматическое гидроксилирование Алициклическое гидроксилирование Алициклическое гидроксилирование Образование эпоксидов N-окисление S-окисление	Нитровосстановление Азоредукция Дегалогенизация Восстановление гидроксиламинов	Гидролиз эфиров и амидов Гидратация эпоксидов Гидролиз амидов	Глюкуронидация Метилирование
Митохондрии	Десульфирование Деалкилирование Дезаминирование Алициклическая ароматизация Дезаминирование	Восстановление сульфоксидов и N-оксидов	Дегалогенизация Гидролиз эфиров	Метилирование Ацетилирование Конъюгация глутатиона Образование пептидов Сульфирование
Цитозоль	Окисление спиртов Окисление альдегидов			

катализирующий реакцию его восстановления с последующим использованием одного из атомов для внедрения в различные органические молекулы (RH) [559]. Второй атом служит для образования воды. Моноксигеназный тип окисления протекает по схеме:



Циклическая функция цитохрома Р-450 (см. рис. 31) включает шесть основных промежуточных этапов [222]. Как уже указывалось, начальная реакция метаболизма — взаимодействие субстрата с окисленным цитохромом Р-450 — может быть зарегистрирована спектрофотометрически, так как образующийся комплекс обладает спектром поглощения. При этом имеются три основных типа спектральных изменений: тип I с $\lambda_{\text{макс}}$ при 385–390 нм и $\lambda_{\text{мин}}$ при 418–427 нм; реверсированный тип I с $\lambda_{\text{макс}}$ при 418–423 нм и $\lambda_{\text{мин}}$ при 385–390 нм; тип II с $\lambda_{\text{макс}}$ при 425–435 нм и $\lambda_{\text{мин}}$ при 390–405 нм [241]. Широкий круг полициклических углеводов вызывает спектральные изменения I типа, а алифатические амины — II типа [421]. Наряду с этим имеется множество ингибиторов, которые дают спектры как I, так и II типа [279]. Связывание субстратов первого типа вызывает переход железа из низкоспинового состояния в высокоспиновое, а субстратов второго типа, наоборот, из высокоспинового в низкоспиновое.

Существенная роль в связывании ксенобиотиков с цитохромом Р-450 принадлежит фосфолипидному компоненту. Микросомальные ферменты моноксигеназной системы защищены липидным «барьером», и окислительному метаболизму субстратов моноксигеназной системы обязательно предшествует этап проникновения их через липидный матрикс микросомальной мембраны [200, 265]. Так, например, способность образовывать каталитически активный комплекс цитохром Р-450 для ряда циклических и алифатических углеводов определяется способностью последних покидать полярную фазу мембраны и за счет гидрофобных взаимодействий внедряться в неполярную [65, 126]. Изменения в кинетике взаимодействия цитохрома Р-450 с субстратами сопровождаются повреждением фосфолипид-зависимой гидрофобной области мембраны [439, 555]. Динамика мультифазного липидного компонента может модулировать конформацию цитохрома Р-450, влияя тем самым на реакции биотрансформации. Именно она, по-видимому, определяет связывание цитохрома Р-450 с субстра-

тами с образованием спектров I и II типа, а также направление его действия в оксигеназных реакциях: либо как оксидаза, либо как пероксидаза. Более того, динамика разделительной липидной фазы может функционально связывать цитохром Р-450 с другими электронтранспортными системами, локализованными в мембранах эндоплазматического ретикулума на некотором расстоянии от последнего [520]. Потеря контроля некоторых функций эндоплазматического ретикулума при выделении может быть связана с нарушением липидной структуры и поэтому может влиять на систему биотрансформации. Наконец, липиды, по-видимому, могут принимать участие в образовании текучего окружения ферментов, которое облегчает транспорт электронов от НАДФ к цитохрому Р-450 [296].

Наиболее характерной чертой для системы микросомального окисления является ее легкая индуцибельность под влиянием широкого спектра химических соединений, включая лекарства, инсектициды и полициклические углеводороды [284]. Содержание микросомальных ферментов в печени обычных животных в 2 раза больше, чем в цитохромах митохондрий. После введения животным, например, фенобарбитала концентрация цитохрома Р-450 становится в 10 раз больше, чем содержание цитохрома с [222, 219]. Это связано с синтезом микросомальных белков *de novo*, который может происходить только в условиях целого организма. Индукция ферментов сопровождается пролиферацией гладкого эндоплазматического ретикулума, увеличением концентрации цитохрома Р-450 в печени и усилением скорости метаболизма ксенобиотиков [63, 179].

Наиболее изучены такие индукторы, как фенобарбитал и 3-метилхолантрен [179]. Индуцирующий эффект, стимулируемый обоими соединениями, имеет различный механизм. Так, фенобарбитальная индукция ферментов активирует почти все реакции, катализируемые цитохромом Р-450, и усиливает окисление субстратов I типа, в то время как 3-метилхолантрен селективно индуцирует только синтез гемопroteида — цитохрома Р-448 (Р₁-450), представленного в микросомах нормального животного небольшой подфракцией. При этом несколько уменьшается содержание основного цитохрома Р-450 [181, 250, 295, 475, 555].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНЫХ ЦЕПЕЙ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Из схемы Эстабука (см. рис. 31) следует, что существует экономное использование ферментов системы микросомального окисления, катализирующих реакции биотрансформации. Оно достигается достаточно широкой специализацией этих систем и возможностью их взаимодействия. С учетом имеющихся на сегодняшний день дополнительных данных, корректирующих эту схему, можно утверждать, что НАДФН-специфический флавопротеид участвует в монооксигеназных реакциях, метаболизирует третичные метилзамещенные амины, восстанавливает азокрасители и нитраты, активирует реакции перекисного окисления липидов, участвует в десатуразной реакции. В то же время НАДН-специфический флавопротеид катализирует десатуразные реакции, участвует в монооксигеназных реакциях, активирует реакции перекисного окисления липидов.

Таким образом, один и тот же процесс может обслуживаться различными электронными потоками. Перекисное окисление липидов, например (помимо неферментативного процесса, активируемого аскорбатом), может катализироваться ферментативными НАДФН- и НАДН-зависимыми реакциями [52, 305]. Точно так же монооксигеназные и десатуразные реакции связаны с поступлением электронов как от НАДФН-специфического флавопротеида, так и от НАДН-специфического флавопротеида.

Эти факты свидетельствуют в пользу возможности взаимодействия путей переноса электронов в системе микросомального окисления и конкурентного распределения в ней потоков электронов. Все это, в свою очередь, может иметь принципиальное значение для проблемы направленного регулирования интенсивности метаболизма различных веществ в клетке и поддержания ее физиологического гомеостаза. Однако для решения этого вопроса важно знать вклад каждой реакции и ее связь с функционально-метаболическими состояниями клетки.

Согласно данным Дженссона и Шенкмана [305], следует, что основными по величине потоков электронов являются три реакции: 1) НАДФН-зависимые монооксигеназные реакции; 2) НАДФН-зависимое окисление мембранных липидов; 3) НАДН-зависимая десатурация жирных кислот. Наряду с этим имеются второстепенные пути (по мощности электронных потоков): 4) НАДФН-зависимая десатурация

жирных кислот; 5) НАДН-зависимое окисление мембранных липидов; 6) НАДН-зависимое окисление ксенобиотиков [304, 305]. Три последних пути дают сравнительно небольшой вклад в общий баланс микросомального окисления. Так, НАДН-зависимое окисление липидов, которое теперь следует уже считать твердо установленным [52, 305], может обеспечить окисление соответствующих субстратов со скоростью, составляющей не более 30% от скорости НАДФН-зависимых реакций. НАДН-зависимая оксидация ксенобиотиков обеспечивает окисление субстратов (например, амидопирин) со скоростью, составляющей всего 10% от скорости НАДФН-зависимого окисления. Значимость этого пути в системе микросомального окисления невелика, видимо, еще и потому, что уровень НАДФН в гепатоцитах значительно выше, нежели уровень НАДН [305].

Таким образом, поток электронов при окислении НАДФН в системе микросомального окисления распределяется на уровне флавопротеида (фц) в основном между тремя электротранспортными цепями, связанными с различными метаболическими функциями, одной из которых является превращение ксенобиотиков. У неиндуцированных животных НАДФН-зависимый метаболизм ксенобиотиков и перекисное окисление липидов более чем на порядок интенсивнее, нежели НАДФН-зависимая десатурация жирных кислот. Когда же все эти три процесса обеспечиваются НАДН, их активности оказываются примерно одинаковыми [305].

Зависимость рассматриваемых реакций от НАДФН объясняет конкурентные отношения между этими цепями. Действительно, активность НАДФН-зависимого окисления ксенобиотиков подавляется в присутствии избытка цитохрома b_5 , что свидетельствует о конкурентных отношениях между системой многоцелевых оксигеназ и НАДФН-зависимой системой десатурации жирных кислот. То же показано для НАДФН-зависимых монооксигеназных реакций и НАДФН-зависимого окисления мембранных липидов у нормальных животных [305]. Так, например, субстраты монооксигеназных реакций — амидопирин и кодеин — ингибируют НАДФН-зависимое перекисное окисление липидов в микросомах печени [437, 438], хотя их эффект проявляется лишь в очень высоких концентрациях (2–10 мМ) [358]. Другие ксенобиотики (например, фенobarбитал после однократного введения) могут не влиять на перекисное окисление липидов [358].

Однако индукция ферментов микросомального окисления (5-кратное введение фенобарбитала) приводила к 2–5-кратному увеличению продукции малонового диальдегида, что свидетельствует об активации перекисного окисления в этих условиях. Это не значит, что возможны обратные отношения. В условиях активирования реакции перекисного окисления липидов комплексом железа с АДФ наблюдается ингибирование метаболизма аллпренолола [288]. Более того, в присутствии высоких концентраций органических гидроперекисей происходит деструкция цитохрома P-450 [288, 358] и возможны ультраструктурные изменения в гепатоцитах [287].

Таким образом, система перекисного окисления липидов в клетке может выполнять функцию естественного регулятора и модулятора процессов окисления ксенобиотиков.

Положительное взаимодействие потоков электронов проявляется лишь для НАДФН — цитохром P-450 редуктазной активности в случае окисления ксенобиотиков, когда еще один электрон поступает от НАДН-специфичного флавопротеида для восстановления цитохрома P-450 (НАДН-синергизм) [176, 177, 179, 278, 279, 305]. Он выражается в том, что активность НАДФН-зависимой дегидрирования ряда соединений I типа, в том числе амидопиррина, значительно увеличивается (на 20–30%) в присутствии НАДН. Однако последний не может поддерживать их метаболизирование без НАДФН [176, 177, 179]. Синергизм НАДН по отношению к НАДФН-зависимой цепи окисления интерпретируется как подтверждение существования второго электронтранспортного пути, участвующего в гидроксировании ксенобиотиков и поставляющего электроны в окисгенированный комплекс цитохром P-450 — субстрат с большей скоростью, чем НАДФН.

НАДН-синергизм обнаруживается не только при окислении субстратов I типа, но и, согласно некоторым данным, для субстратов II типа. Он усиливается после предварительного введения животным фенобарбитала или 3-метилхолантрена.

Возможность представленных отношений предполагает наличие двух пулов цитохрома b_5 , что в свое время было предсказано и показано А. И. Арчаковым [2]. Один из них устойчив к антителам, другой легко ими ингибируется [305]. Различные цитохром b_5 -зависимые реакции протекают с участием различных его пулов. НАДН — ци-

тохром редуктазная активность и НАДН-синергизм реализуются за счет использования второго пула, в то время как в реакциях десатурации жирных кислот и метаболизма ксенобиотиков участвует общий пул цитохрома b_5 .

Прямое поступление электронов от $фп_2$ к $фп_1$ также имеет место, но с такой низкой скоростью, что практически этой реакцией можно пренебречь [305].

ПРОЦЕССЫ МЕТАБОЛИЗИРОВАНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ В ИНТАКТНОЙ КЛЕТКЕ

Молекулярные механизмы функционирования различных редокс-цепей исследуются, как правило, на изолированных полиферментных системах (митохондриях, микросомах, ядерных мембранах, реконструированных системах). Это же касается изучения метаболизма ксенобиотиков в условиях *in vitro*, проводимого в подавляющем большинстве случаев на изолированных микросомах. Однако в последние годы происходит серьезная ревизия методических подходов в этом вопросе, основанная на том соображении, что получаемые результаты ни количественно, ни качественно в полной мере не отражают ситуации, имеющие место *in vivo* [241]. Действительно, имеются серьезные аргументы в пользу того, что функциональные аспекты метаболизирования ксенобиотиков могут и должны изучаться в условиях сохранения интегрированности внутриклеточных процессов и интактности клетки.

Так, например, процесс гомогенизации, благодаря деструкции мембранных компонентов и кофакторов, сопровождающейся освобождением лизосомальных энзимов, может приводить к артефактным метаболическим изменениям, активации или ингибированию различных энзимов. В свое время было показано, что функциональное состояние митохондрий в гомогенате резко изменено и оно вызывает подавление микросомальной бифенил-2- и бифенил-4-гидроксилазной активности [90]. Гомогенизация сопровождается также нарушением компартментализации эндогенных ингибиторов, их высвобождением и появлением в среде [356], изменением свойств фосфолипидного комплекса [52].

В экспериментах на изолированных субклеточных системах концентрации кофакторов, используемых для инкубации, обычно не соответствуют их физиологическим уровням в клетке. Поэтому может идти непредвиденное об-

разование метаболитов, не имеющее место *in vivo*. Примером является образование токсических продуктов в нитроредуктазных реакциях, когда используются очень высокие концентрации кофакторов. В интактной клетке промежуточные метаболиты, в том числе и токсические, могут связываться белками или быстро конъюгироваться и выводиться из клетки.

Следует учитывать также, что метаболизм одного вещества в целой клетке может быть связан с различными субклеточными структурами, в которых реализуются отдельные звенья целого процесса. Ниже рассматривается соответствующий случай с этанолом, начальные этапы метаболизма которого протекают в разных метаболических путях цитозоля, а промежуточные продукты окисляются в митохондриях. Сходная ситуация имеет место при метаболизировании антидепрессанта имипрамина. В эндоплазматическом ретикулуме происходит N-оксидация, N-деметилирование и ароматическое гидроксילирование этого соединения. Промежуточный продукт имипрамин-N-оксид может быть восстановлен снова в имипрамин либо подвергнут N-деметилированию в цитозоле. Это N-деметилированное производное вступает в реакцию конъюгации в микросомальной системе [104]. Примеры могут быть продолжены.

Чрезвычайно важным моментом является взаимодействие различных субклеточных структур при метаболизировании ксенобиотиков. Ниже рассматривается возможность взаимовлияния митохондрий и микросом в этом процессе, приводящего в определенных случаях либо к усилению, либо к ослаблению активности микросомального окисления и изменению функционального состояния митохондрий [169—171, 444]. Естественно, что этот метаболический контроль не может осуществляться в изолированной микросомальной фракции, где он, следовательно, не может быть учтен.

Наконец, метаболизм ксенобиотиков в интактной клетке зависит от проницаемости клеточной мембраны и от характера поступления ксенобиотиков. Так, например, накопление в клетке вещества типа метотрексата связано с активным транспортом [293]. Все это делает желательным использование интегрированных систем с сохраненной структурой клетки для изучения функциональных аспектов активности системы микросомального окисления.

В настоящее время имеются доказательства, что боль-

шинство окислительных процессов, описанных для изолированной микросомальной фракции, протекает в срезах, гепатоцитах и перфузируемой печени [168—171, 405, 440, 509, 546]. Большая часть цитохрома P-450 в изолированных клетках и перфузируемой печени находится в окисленной форме, не связанной с субстратом, и легко связывается с поступающими молекулами субстратов [260, 414, 415, 510]. Субстраты микросомального окисления (алпренолол, амидопирин) обнаруживают высокое сродство к цитохрому P-450 и могут образовывать с ним, как и в изолированных микросомальных препаратах, в течение 1,5—2 с комплексы I и II типа [415, 509], что свидетельствует о конверсии части гемопroteinовой его формы из низкоспинового состояния в высокоспиновое. Однако эндогенные субстраты имеют преимущества в связывании с цитохромом P-450 за счет более высокого сродства к нему. Эти комплексы регистрируются с помощью адсорбционного спектрофотометрического метода [116—118, 170, 440, 505, 509, 510]. Процесс сопровождается соответствующими изменениями поверхностной флуоресценции и увеличением потребления кислорода [416]. Однако в клеточных системах специфическое связывание вещества с цитохромом P-450 исчезает по мере образования метаболитов [260, 440, 509].

Скорость метаболизирования субстратов микросомального окисления в гепатоците близка к скорости гидроксילирования в изолированной микросомальной + НАДФН-генерирующей системе [415, 416]. Предварительное введение животным фенobarбитала увеличивает в несколько раз уровень содержания цитохрома P-450 в гепатоцитах. Эти изменения фиксируются на спектрах связывания вещества [415, 416, 572]. В этих же исследованиях удалось зарегистрировать для веществ, дающих спектры первого типа, появление нового абсорбционного пика при $\lambda=437$ нм, за которым следовал еще один пик при $\lambda=446$ нм [415, 416, 572]. Предполагается, что в случае с алпренололом эти пики отражают образование оксигенированной формы комплекса цитохром P-450 — субстрат.

Вещества, дающие в микросомах спектры II типа, в изолированных гепатоцитах образовывали смешанные спектры, включающие компоненты I и II типа [416]. Энзимная активность различных ферментных систем в изолированных гепатоцитах поддерживается за счет эндогенных кофакторов на высоком уровне и очень близка к

тому, что получается при измерениях на изолированных микросомах в присутствии НАДФН-генерирующей системы [415, 587]. При этом уровень цитоплазматических кофакторов может лимитировать метаболизм ксенобиотиков [416, 587].

Специфический ингибитор цитохром Р-450 оксигеназной активности SKF-525А одинаково подавляет метаболизм алпренолола и бифенил-4-гидроксилазную активность в гепатоцитах и микросомах [416, 587].

Благодаря сохранению специфических свойств, характерных для микросомальной фракции в клеточных и тканевых моделях, последние широко используются в настоящее время для исследования метаболизма ксенобиотиков самого широкого спектра. Изучены такие вещества, как этилморфин, анилин, бенз(α)пирен, алпренолол, амидопирин, дифенилгидантоин, бензойная кислота, анилин, фенол, бифенил, этоксикумарин, гексобарбитал, нафталин, хинин, дансиламид и антипирин, п-нитрофенол, п-нитроанизол. Все проведенные в этом направлении исследования свидетельствуют о том, что в отличие от микросом клеточно-тканевые системы позволяют изучать не только процесс метаболизирования ксенобиотиков в системе оксигеназ смешанного типа, но и дальнейшие этапы их метаболизма в клетке. Так, на примере метаболизма бенз(α)-пирена показано его превращение в фенолы, дигидродиолы и их конъюгаты. Гепатоциты, полученные от неиндуцированных крыс, легко образовывали конъюгаты и свободные дигидродиолы, в то время как фенолы аккумулировались в клетке. В гепатоцитах, полученных от крыс, индуцированных 3-метилхолантrenom, общее количество фенолов и дигидродиолов было значительно больше, а процесс конъюгации усиливался незначительно. Межклеточная аккумуляция диолов и фенолов была усилена.

Возможность изучения процессов метаболизирования на клеточно-тканевых препаратах открывает перспективы для использования биопсийного материала, эксплантатов культуры различных тканей, клеточных суспензий и монослоев и даже отдельных клеток для подобного рода исследований.

СООТНОШЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И НЕМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ КИСЛОРОДЗАВИСИМЫХ ПУТЕЙ В КЛЕТКЕ

Решение этого вопроса связано со значительными методическими трудностями. Оценка абсолютного и относительного вклада метаболических путей, связанных с потреблением кислорода, проводится обычно с помощью ингибиторного анализа, т. е. путем искусственного исключения работы различных звеньев метаболизма. Однако, по-видимому, практически не существует ингибиторов, которые в условиях интактной клетки не влияли бы на другие метаболические пути различных компартментов и гарантировали бы полное исключение лишь какой-то одной реакции. Так, цианиды являются специфическими ингибиторами цитохромоксидазы. Тем не менее в более высоких концентрациях они могут взаимодействовать с цитохромом Р-450, подавляя активность монооксигеназных реакций. Кроме того, они являются ингибиторами каталазы, ксантиноксидазы и других оксидаз цитозоля. В этом случае ингибирующий эффект проявляется при концентрациях, которые еще не действуют на дыхательную цепь митохондрий. Амита, как и другие барбитураты (гексобарбитал, фенобарбитал и пр.), являясь ингибитором транспорта электронов в НАД-зависимом участке дыхательной цепи митохондрий, наряду с другими ксенобиотиками может метаболизироваться в системе монооксигеназных реакций. Антиимипин А в клеточных системах может взаимодействовать с внутриклеточными белками раньше, чем проявится его эффект, связанный с дыхательной цепью. Кроме того, он может инициировать образование H_2O_2 , что также может искажать конечный результат, измеряемый по дыханию.

Все это заставляет тщательно подбирать оптимальные для конкретных задач дозы ингибиторов, которые в силу этого не всегда будут оказывать максимальную степень действия и не всегда могут обеспечить уверенность в том, что специфическое ингибирование того или иного фермента произошло и работа данного метаболического пути полностью исключена. Таким образом, ингибиторный анализ дает сведения лишь об относительных изменениях и трудности при интерпретации получаемых результатов увеличиваются при переходе от изолированных субклеточных систем к целой клетке. Тем не менее при разум-

ном применении ингибиторный анализ остается орудием исследования относительной активности метаболических путей и их взаимодействия в клеточных системах [498, 509, 546]. Так, например, чувствительность общего дыхания клеток и перфузируемых органов к специфическим ингибиторам цитохромоксидазы используется в качестве относительного показателя участия альтернативных путей в потреблении кислорода [2, 498, 546].

При рассмотрении действия KCN на дыхание клеточно-тканевых препаратов прежде всего обращает на себя внимание, что часть KCN всегда остается нечувствительной к высоким концентрациям ингибитора (10^{-3} – $3 \cdot 10^{-3}$ М), которые, судя по показателям окислительного фосфорилирования и резкому уменьшению отношения [АТФ]/[АДФ] в клетке, практически полностью подавляют электрон-транспортную и энергообразующую функцию дыхательной цепи митохондрий (рис. 11).

Представленные в табл. 11 данные по ЦРД для срезов печени сходны с результатами, полученными на гепатоцитах [2], где также была показана его зависимость от окисляемых субстратов. Из табл. 11 следует, что в обычных условиях (в отсутствие субстратов гидроксирования) определенное количество кислорода, потребляемое клеткой, может быть связано с процессами немитохондриального окисления. Остаточное, нечувствительное к цианиду дыхание зависит от субстрата окисления. Оно минимально в присутствии глюкозы и сукцината (относительно исходного дыхания) и увеличивается в присутствии НАДФН или субстрата микросомального окисления амидопирина. Наименьшая чувствительность к KCN и наибольшие относительные и абсолютные значения остаточного дыхания зарегистрированы в случае совместного добавления амидопирина и НАДФН. Однако, если амидопирин добавлен на фоне субстратов дыхательной цепи, смеси глутамата+малата или сукцината, значения ЦРД, характерные для последнего, не меняются.

Направленность изменений значений абсолютного и относительного остаточного дыхания после добавления амидопирина полностью коррелирует (см. табл. 11). Таким образом, судя по ЦРД, вклад немитохондриальных реакций может составлять в печени до 40% и, как правило, значительно меньше в мозге (см. табл. 9).

В присутствии же субстратов монооксигеназных реакций этот вклад увеличивается в печени (см. табл. 11). Од-

Таблица 11. Действие KCN ($3 \cdot 10^{-3}$ М) на скорость окисления различных субстратов в срезах печени мышей

Субстрат	Исходное дыхание	Остаточное дыхание	ЦРД, % к исходному	Остаточное дыхание + амидопирин/остаточное дыхание без амидопирина
	нмоль O₂ мин·мг ткани			
Эндогенный	0,55	0,13	24	—
Глюкоза	0,41	0,06	14	—
Сукцинат	1,55	0,17	11	—
Глутамат + малат	0,45	0,17	39	—
НАДФН	0,85	0,24	29	—
Амидопирин	0,60	0,24	48	1,8
Амидопирин + глюкоза	0,38	0,13	35	2,1
Амидопирин + сукцинат	1,40	0,17	12	1,0
Амидопирин + (глутамат + малат)	0,40	0,16	40	1,0
Амидопирин + НАДФН	0,95	0,33	35	1,3

Примечание. Срезы исследовали через 60 мин после инкубации в бикарбонатном буфере, содержащем 10 мМ глюкозы ($t=37^\circ\text{C}$, pH 7,4). Концентрации субстратов: сукцинат, глутамат + малат (1:1), глюкоза — 10 мМ; НАДФН — 1 мМ; амидопирин — 4 мМ.

нако в ткани мозга амидопирин не влияет на величину ЦРД; образование формальдегида при этом также не происходит. Активация дыхательной цепи сукцинатом уменьшает эту величину в печени и не изменяет ее в мозге. Таким образом, наблюдаемые изменения несомненно обусловлены перераспределением вклада кислородзависимых реакций в клетке, но, связаны ли они именно с активностью монооксигеназных реакций или каких-то иных путей, остается неясным. Ингибитор цитохрома P-450 SKF-525A подавляет дыхание срезов печени примерно на 20–40% (табл. 12). Эффект проявляется и на фоне ингибитора цитохромоксидазы азида (рис. 32), но отсутствует в срезах мозга.

Наличие чувствительного к SKF-525A дыхания в печени и его отсутствие в мозге, где содержание цитохрома P-450 на порядок ниже, чем в печени, свидетельствует в пользу того, что определенный вклад в кислородзависимые процессы в данной ткани вносят цитохром P-450-зависимые реакции даже в том случае, когда экзогенные субстра-

Таблица 12. Действие SKF-525A ($5 \cdot 10^{-5}$ M) на дыхание срезов (нмоль $O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ сырого веса) печени и мозга *

Субстрат	Печень			Мозг		
	исходное дыха- ние	дыхание после SKF-525A	РД, % к ис- ходному	исходное дыха- ние	дыхание после SKF-525A	РД, % к ис- ходному
Глюкоза	0,5	0,23	46	0,85	0,95	0
Сукцинат	1,53	0,29	19	1,02	1,02	0
Глутамат + малат	0,55	0,09	22	0,24	0,26	0

* См. примечание к табл. 11.

Обозначение. РД — резистентное дыхание к SKF-525A.

ты монооксигеназной цепи окисления отсутствуют. Следовательно, в нормальных условиях некоторую часть клеточного дыхания (до 20%) могут составлять альтернативные кислородзависимые реакции, связанные с активностью цитохрома P-450. Это согласуется с данными о том, что в гепатоцитах и перфузируемой печени некоторая его часть (до 6%) находится в восстановленном состоянии в отсутствие экзогенных субстратов микросомального окисления [116, 117, 509], т. е. система функционирует за счет окисления эндогенных субстратов.

Так как небольшая часть клеточного дыхания сохраняется и после совместного действия двух ингибиторов, следует также вывод, что некоторый вклад в общее потребление кислорода клеткой вносят пути, не связанные ни с митохондриальным окислением, ни с монооксигеназными реакциями.

Присутствие субстратов и кофактора микросомального окисления увеличивает не только ЦРД, но и действие SKF-525A (см. рис. 32). Таким образом, происходит перераспределение вклада O_2 -зависимых реакций в общий кислородный баланс клетки в пользу монооксигеназных процессов.

Ответная реакция на субстраты микросомального окисления может быть выявлена не только по величине ЦРД. В системе изолированных микросом эти субстраты стимулируют скорость потребления кислорода, сопряженного

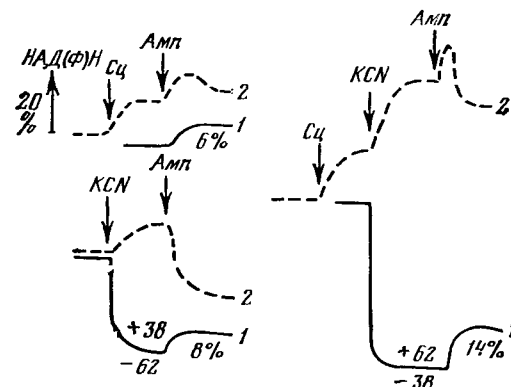


Рис. 32. Действие амидопирина на дыхание срезов (1) и изменение восстановленности НАД(Ф)Н (2)

с процессом гидроксирования. В клеточной системе этот эффект воспроизводится необязательно, хотя он и был показан для срезов, гепатоцитов и перфузируемой печени [414—416, 493, 498, 546]. Однако эта стимуляция очень незначительна и может не быть выявлена вовсе, особенно если она проходила на фоне неиндуцированной системы микросомального окисления [6, 116, 117, 497]. Более того, возможно даже подавление исходного дыхания в случае, когда концентрации субстратов монооксигеназной реакции были высокими, и в связи с этим могло произойти их взаимодействие с гидрофобным НАД-зависимым участком дыхательной цепи (см. далее) [67, 116, 117]. Однако стимулирующий дыхание эффект становится очевидным на фоне предварительно заингибированной дыхательной цепи митохондрий. В этом случае амидопирин (или другой субстрат микросомального окисления) дает, как правило, небольшое, но достоверное увеличение потребления кислорода (рис. 33), сопровождаемое увеличением степени восстановленности цитохрома P-450. Величина стимулированного дыхания, по данным разных авторов, составляет в этом случае до 10% [116, 117, 509, 546].

Учитывая, однако, наличие чувствительной к SKF-525A компоненты остаточного дыхания, следует сделать поправку к этой величине. O_2 -зависимые процессы в печени, связанные с активностью монооксигеназных ре-

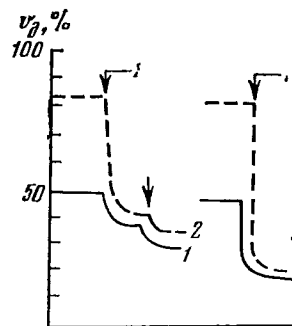


Рис. 33. Действие SKF-525A ($5 \cdot 10^{-4}$ M) и азида ($5 \cdot 10^{-2}$ M) на дыхание срезом печени
1 — контрольные животные; 2 — после введения фенobarбитала. Стрелками показано внесение азида и SKF (слева) и SKF и азида (справа)

акций у животных с неиндуцированной системой микросомального окисления, могут, видимо, составлять до 30% от общего дыхания клеток. Это соответствует восстановлению цитохрома P-450 на 10–40% [505].
Известно, что многие ксенобиотики при хроническом их введении животным увеличивают количество микросомальных ферментов и их активность. Так, на фоне 3-дневного введения фенobarбитала (80 мг/кг веса животного ежедневно) увеличивается вес печени, индуцируется пролиферация гладкого эндоплазматического ретикула, в 2–3 раза возрастает содержание НАДФН — цитохром с редуктазы и цитохрома P-450 [415, 437, 476]. Сравнительно небольшие изменения дыхания и флуоресценции клеток интактных животных после введения амидопирин значительно усиливаются на фоне хронического введения фенobarбитала. Согласно Турману [546], амидопирин может стимулировать при этом дыхание перфузируемой печени на 21–40%, в то время как у контрольных животных — не более чем на 7%. Сходные данные получены нами на срезах печени [6]. У неиндуцированных животных амидопирин, как правило, ингибирует дыхание таких срезов. Однако после введения фенobarбитала знак реакции обращается и проявляется стимулированное амидопирином усиление потребления кислорода. Интенсивность метаболизма ксенобиотиков также увеличивается. Так как, по нашим данным, тканевое дыхание при этом практически не меняется ($1,12 \pm 0,11$ нмоль $O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ у контрольных животных и $1,36 \pm 0,14$ после фенobarбитала при окислении эндогенных субстратов), доля кислорода, обеспечивающая функционирование системы микросомального окисления, во втором случае тем самым увеличивается. Это согласуется с результатами, полученными другими исследователями [437, 438, 498, 509, 510].

Таблица 13. Величина ЦРД в печени (мышь) с неиндуцированной и индуцированной фенobarбиталом системой микросомального окисления (3-кратное введение фенobarбитала по 80 мг/кг) *

Субстрат	ЦРД, % к исходному дыханию		Опыт
	Контроль	Фенобарбитал	
Эндогенный	24	39	1,6
Глюкоза	14	40	2,9
Сукцинат	11	18	1,6
НАДФН	29	50	1,7
Амидопирин	48	61	1,3
Амидопирин + сукцинат	12	37	3,1
Амидопирин + глюкоза	35	37	1,0
Амидопирин + НАДФН	35	47	1,3
Амидопирин + НАДФН + сукцинат	16	27	1,7

* См. примечание к табл. 11.

В условиях индукции системы микросомального окисления происходит увеличение ЦРД при окислении субстратов дыхательной цепи, наблюдаемое даже в отсутствие амидопирин, т. е. вклад немитохондриальных кислородопотребляющих процессов, как правило, нарастает (табл. 13).

Одновременно увеличивается скорость метаболизма амидопирин (табл. 14).

Из табл. 13, 14 следует также, что относительные изменения величин ЦРД и скорости образования формальдегида у контрольных и фенobarбитальных животных не коррелируют между собой. Так, например, в случае совместного применения сукцината и амидопирин ЦРД у фенobarбитальных животных резко увеличивается, но это соответствует сравнительно небольшим изменениям в скорости метаболизма амидопирин. Это еще раз свидетельствует в пользу того, что ЦРД отражает не только активность монооксигеназных реакций.

Наконец, следует обратить внимание еще на одну характерную особенность. После индуцирования микросомальных ферментов фенobarбиталом роль различных субстратов, поддерживающих активность монооксигеназной реакции, меняется. Если у контрольных животных скорость окисления амидопирин была максимальной в при-

Таблица 14. Влияние 3-кратного введения фенобарбитала животным (80 мг/кг) на скорость образования формальдегида (нмоль·г⁻¹·10 мин⁻¹) в срезах печени мышей при окислении амидопирина *

Субстрат	Формальдегид		Опыт
	Конт-роль	Фено-барби-тал	Конт-роль
Амидопирин	61	90	1,5
Амидопирин + сукцинат	72	92	1,3
Амидопирин + глюкоза	62	70	1,1
Амидопирин + (глутамат + малат)	31	90	2,9
Амидопирин + α-кетоглутарат	24	120	5,0
Амидопирин + малат	14	36	2,6
Амидопирин + НАДФН	178	425	2,4
Амидопирин + сукцинат + НАДФН	188	485	2,5
Амидопирин + малат + НАДФН	260	430	1,7
Амидопирин + α-кетоглутарат + НАДФН	108	525	4,8

* См. примечание к табл. 11.

сутствии сукцината (не считая случаев, когда в среду окисления вводился экзогенный НАДФН), а α-кетоглутарат и малат обеспечивали самую низкую скорость гидроксилирования, то у фенобарбитальных животных «ведущим» субстратом становится α-кетоглутарат, а сукцинат уже не имеет преимуществ перед другими субстратами.

РОЛЬ КИСЛОРОДА И НАДФН В МИКРОСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ

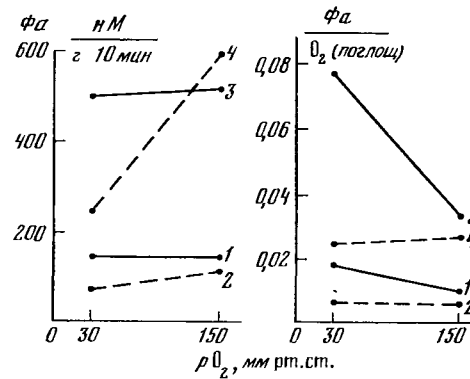
Общим итогом реакций, катализируемых как митохондриальными, так и микросомальными окислительными системами, является утилизация кислорода и восстановительных эквивалентов в виде НАДФН, т. е. реакции имеют общие точки соприкосновения в системе метаболических процессов. Поэтому, естественно, встает вопрос: конкурируют ли они за эти два параметра?

Как следует из изложенного, ферментные системы электронтранспортных редокс-цепей эндоплазматического ретикулума и митохондрий резко отличаются друг от друга. Каждая из них имеет свой специфический набор фла-

Рис. 34. Скорость образования формальдегида (Фа) в срезах печени в зависимости от рО₂ в среде

1, 2 — контрольные животные;
3, 4 — животные после хронического введения фенобарбитала.

К инкубационной среде (раствор Тироде, t=37° С) добавлены: 4 мМ амидопирин + 1 мМ НАДФН (1, 3) и 10 мМ сукцината + 4 мМ амидопирина + 1 мМ НАДФН (2, 4)



вопротеидов и цитохромов [2]. Удельное содержание цитохромов в микросомах в 1,5–2 раза выше, чем в митохондриях, а митохондрии богаче микросом по содержанию флавопротеидов [2, 222]. На основании этих данных делается вывод, что по своей возможной каталитической мощности микросомальные дыхательные цепи в печени не уступают митохондриальным [2].

Более того, сродство терминальной оксидазы микросомальных цепей переноса электронов к кислороду настолько велико, что позволяет ей эффективно конкурировать за О₂ с цитохромоксидазой. Известно, что К_м для кислорода в изолированных микросомах равна 4–5·10⁻⁶ М [183, 222, 518], а для митохондрий 0,02–0,5·10⁻⁶ М [173, 196]. Однако, учитывая, что концентрация кислорода в венозной крови не бывает меньше 10⁻⁴ М, а в клетке она равна 10⁻⁵ М [546], следует полагать, что в условиях *in vivo* у нормальных животных это количество окажется достаточным для обеспечения окислительных реакций в обеих цепях. Таким образом, в условиях целого организма в норме кислород, по-видимому, не является лимитирующим звеном для активности ферментов как микросомальной, так и митохондриальной дыхательных цепей [546].

Уменьшение рО₂ в достаточно широких пределах практически не влияет на скорость метаболизирования субстратов микросомального окисления (например, амидопирина) (рис. 34). Однако относительное количество кислорода, участвующего в этой реакции, увеличивается при гипоксии, особенно у фенобарбитальных животных за счет

ограничения потребления кислорода дыхательной цепью. Сукцинат восстанавливал активность дыхательной цепи и подавлял окисление амидопирина и образование формальдегида в этих условиях. Таким образом, взаимоотношения двух цепей в этих условиях строятся по типу конкурентных, хотя O_2 еще не лимитирует оба процесса.

При низких pO_2 различия между K_m (O) цитохром-оксидазы и терминальной оксидазы митохондриальных редокс-цепей могут начать сказываться. В этом случае субстраты монооксигеназных реакций будут восстанавливать дыхание клетки.

Реакции митохондриального окисления, связанные с метаболизмом ксенобиотиков, являются НАДФН-зависимыми. Стехиометрия утилизации кислорода и НАДФН, а также образование продукта равны 1:1:1 [436]. Клетка имеет свои эндогенные резервы НАДФН и источники его образования, необходимые для поддержания этих реакций. Ранее считалось, что образование НАДФН из эндогенных субстратов в срезах и гепатоцитах достаточно для длительного метаболизма высоких концентраций субстратов митохондриального окисления [168, 170, 171, 241, 261, 317, 505, 546]. Т. е. изолированные клеточные системы способны поддерживать достаточно высокие значения отношения НАДФН/НАДФ⁺ в цитозоле за счет эндогенных ресурсов независимо от их функционального состояния. Поэтому, казалось бы, что НАДФН, так же как и кислород, не должен был бы лимитировать митохондриальные реакции. Однако он, несомненно, является контролирующим и регулирующим фактором для функции митохондриального окисления *in vivo* [392], необходимым кофактором в условиях *in vitro* [546] и в определенных ситуациях (например, при дефиците глюкозы) может играть роль лимитирующего фактора [261, 505].

В интактной клетке имеются различные возможности для внемитохондриальной генерации НАДФН. Главными являются: а) гексозомонофосфатный шунт (ГМФС); б) малатдегидрогеназная (малик-фермент) реакция; в) изоцитратдегидрогеназная реакция [343]. Первые две реакции локализованы в растворимой части цитозоля клетки [343], последняя — в митохондриях. Таким образом, генерация НАДФН может происходить в различных клеточных пулах. Однако окисляется он главным образом в мембранах эндоплазматического ретикулула, где ис-

пользуется на нужды синтетических процессов в катализируемой им реакции [2].

НАДФН образуется при дегидрировании глюкозо-6-фосфата в первом положении до 6-фосфоглюконата и затем при дегидрировании последней с образованием CO_2 и рибулозо-5-фосфата. Малик-фермент катализирует дегидрирование малата и дает НАДФН, CO_2 и пируват. Постоянным источником малата является НАДН-зависимое восстановление оксалоацетата, катализируемое малатдегидрогеназой. НАДФН, образованный в этих двух реакциях, видимо, компартментализован и не образует общего внутриклеточного пула [343]. Предполагается, что различные пулы цитозольного НАДФН имеют неодинаковое сродство к НАДФН-зависимым реакциям [343]. Тем не менее существует конкуренция за общий НАДФН между монооксигенажными реакциями, глюконеогенезом, синтезом жирных кислот [494, 547]. Эта конкуренция в присутствии высоких концентраций субстратов митохондриального окисления заканчивается подавлением либо глюконеогенеза, либо синтеза жирных кислот в пользу монооксигенажных реакций [494, 547] и предполагает тесную кооперацию между метаболическими путями, ответственными за образование НАДФН в клетке (рис. 35).

Активация митохондриального окисления в клетках, так же как и в изолированных митосомах, максимальна в присутствии НАДФН [261, 414, 416, 505, 510] и не замедляется НАДН или НАДФ⁺ [414, 416, 505]. У сытых животных большая часть НАДФН генерируется через ГМФС даже в условиях неиндуцированной феноталом системы митохондриального окисления. Однако после индукции количество НАДФН, образующегося в ГМФС и используемого в монооксигенажных реакциях, увеличивается. Так, при окислении гексобарбитала отношение НАДФН, образованного через ГМФС, к НАДФН, используемому в реакциях окислации у контрольных животных, составляет 6:1, а после феноталала — 9:1 [317].

Метаболизм субстратов митохондриального окисления в изолированных митосомах сопровождается увеличением степени окисленности внутриклеточного пула пиридиннуклеотидов. В клеточно-тканевых системах это также показано [90, 154] и установлено, что существенных изменений в пуле флавинов при этом не происходит. Цитозольный пул свободных НАДН также не

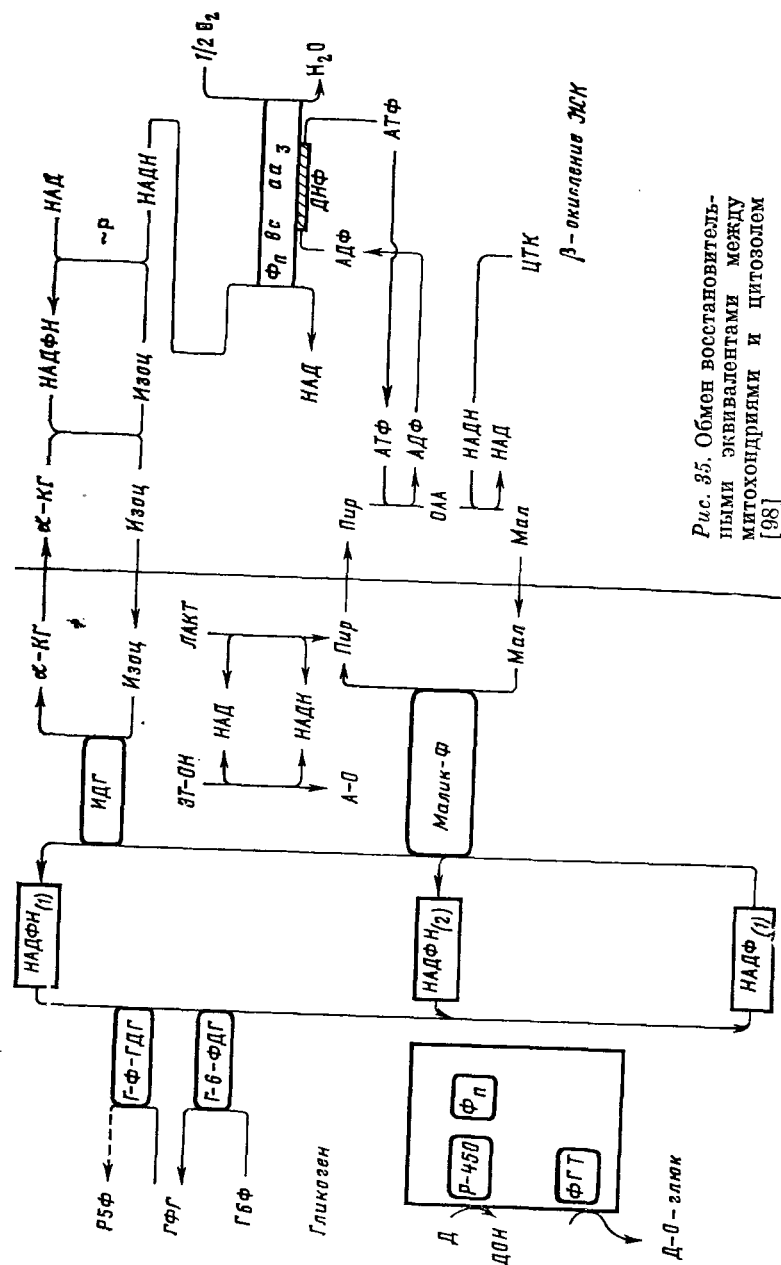


Рис. 35. Обмен восстановительными эквивалентами между митохондриями и цитозолем [98]

подвергается редокс-изменениям при метаболизме ксенобиотиков [544]. В перфузируемой печени животных, обработанных фенobarбиталом, отношение НАДФН/НАДФ⁺ в присутствии гексобарбитала уменьшается (например, от 4,0 до 2,3). Таким образом, общая степень восстановленности НАДФН или отношение НАДФН/[НАДФН+НАДФ⁺] снижается от 80 до 70%. Так как содержание внемитохондриального НАДФН+НАДФ⁺ составляет примерно 1/3 от общего внутриклеточного пула,

Таблица 15. Редокс-потенциал (мВ) свободных никотинамиднуклеотидов цитозоля и цитохрома Р-450 в перфузируемой печени крысы после введения им фенobarбитала [544]

Субстрат	НАДФН	НАД	Цитохром Р-450
-	-391	-241	-335
Амидопирин (1 мМ)	-380	-244	-180(-390)

эти изменения в действительности весьма существенны [317, 505, 510]. В процессе метаболизирования вещества и образования продукта гидроксирования изменения флуоресценции и дыхания уменьшаются и происходит восстановление исходного уровня процессов. Аналогичные данные получены для гепатоцитов и срезов печени. Как уже отмечалось выше, реакция сопровождается также спектральными изменениями цитохрома Р-450, свидетельствующими об образовании восстановленного субстрат-ферментного комплекса [415, 510] и изменении редокс-потенциала компонентов микросомальной редокс-цепи (табл. 15).

МИКРОСОМАЛЬНО-МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ АКТИВАЦИИ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ РЕАКЦИЙ

Известно, что сохранение интегрированности клетки, обеспечивающее более полноценное функциональное взаимодействие органелл, способствует усилению функции микросомальной системы. Так, срезы печени обнаруживают способность окислять ксенобиотики в значительно

большей степени, чем гомогенат и чем изолированные микросомы [104]. Активность системы микросомального окисления в срезах и в гепатоцитах примерно одинакова и увеличена в перфузируемой печени [168, 170]. Более прямые подтверждения важности контакта между митохондриями и микросомами были получены в работах Синти и сотрудников [168—171]. Ими было показано, что ряд субстратов цикла Кребса (сукцинат, изоцитрат, α -кетоглутарат) увеличивали в 2—4 раза степень восстановления цитохрома P-450 в срезах печени, гепатоцитах, гомогенатах и смеси микросом и митохондрий, если они были добавлены в среду, содержащую субстраты микросомального окисления I типа (амидопирин, этилморфин). Они же стимулировали скорость окисления этих субстратов сравнительно с окислением в присутствии одного НАДФН. Сукцинат обеспечивал максимальную оксидацию и спектральные изменения цитохрома P-450. Его эффект полностью подавляется малонатом. Другие субстраты цикла Кребса (фумарат, оксалоацетат и малат) оказывали, по данным тех же авторов, ингибирующее действие на процесс гидроксилирования в срезах и гепатоцитах [168, 414].

В реконструированной системе (митохондрии+микросомы) действие субстрата на скорость потребления кислорода (V_d) было не аддитивно по отношению к действию на дыхание митохондриальной и микросомальной фракций, взятых в отдельности. Так, отношение V_d (митохондрии+микросомы)/ V_d митохондрии+ V_d микросомы было равно единице только при использовании в качестве субстрата окисления экзогенного НАДФН. Для амидопирина оно было равно 0,3, для смеси амидопирин+сукцинат — 0,5, для амидопирин+НАДФН — около 2, для сукцината — больше 2. Максимальное значение этого отношения (4,5) было зарегистрировано при окислении сукцината на фоне частичного блока дыхательной цепи митохондрий цианидом. Такой «супераддитивный» эффект от некоторых субстратов цикла трикарбоновых кислот, не наблюдающийся во фракции изолированных микросом и ослабляющийся при смешивании суспензии митохондрий и микросом, предполагает качественные отличия в реализации реакций гидроксилирования, появляющиеся в интактной ткани сравнительно с изолированными микросомами. Они могут быть связаны, по-видимому, с существованием особого межмембранного переноса [414], так как для его проявления необходим прямой контакт между этими

структурами. Так как эффект сукцината проявлялся и в присутствии НАДН, авторы пришли к выводу, что при активации монооксигеназной системы смысл синергизма в работе двух редокс-цепей состоял в получении дополнительного электрона из дыхательной цепи митохондрий через путь, не связанный с транслокацией протона на субстратном ее участке. Таким образом, впервые был конкретно рассмотрен вопрос о мембранном обмене электронами между двумя этими цепями на уровне терминальных митохондриальных электронтранспортных цитохромов, включающемся в работу системы микросомального окисления.

Принципиальная возможность такого обмена была предсказана раньше. Схема переноса электронов с помощью цитохрома с из НАДН—цитохром b_5 редуктазной системы внешней мембраны митохондрий в цитохромоксидазную цепь внутренней митохондриальной мембраны была предложена В. П. Скулачевым [71]. Уже тогда им отмечалось, что этот путь дает возможность регулировать отношение $[\text{НАДН}]/[\text{НАД}^+]$ в цитоплазме. Позднее А. И. Арчаковым и сотрудниками [2, 4] была установлена система переноса электронов из НАДН-специфичной цепи микросом в цитохромоксидазную систему митохондрий на уровне цитохромов с и b_5 . Вопрос этот успешно изучается в настоящее время [3].

Такая организация метаболизма, при которой достаточно жесткая компартментализация ферментных систем дополняется наличием определенных путей для трансмембранного переноса протонов или электронов, открывает широкие возможности для осуществления регуляции окислительных процессов в клетке. Существование «межмембранных потоков» между различными субклеточными структурами, видимо, совершенно реально. Возможность их появления между мембранами эндоплазматического ретикулула и наружной мембраной ядра показана, например, для животных с индуцированной фенobarбиталом системой микросомального окисления [199, 240].

Тем не менее основная масса исследований, посвященных митохондриально-микросомальным отношениям, сосредоточена на рассмотрении обмена восстановительными эквивалентами на субстратной стороне дыхательной цепи [415, 440, 505, 509, 544].

Принципиальная возможность такой связи между окислительными процессами в митохондриях и цитозоле не

вызывает сомнения. Она основана на существовании челночных систем, способных осуществлять специфический перенос протонов через митохондриальную мембрану в цитозоль и в обратном направлении (см. рис. 35). При этом возникает возможность окисления (восстановления) цитоплазматического фонда пиридиннуклеотидов при участии дыхательной цепи. Этот механизм имеет исключительное значение в тех случаях, когда необходима мобилизация митохондриального НАДН (а это основная масса восстановленного НАД клетки) на нужды немитохондриальных систем. Мембраны митохондрий, как известно, непроницаемы для НАДН, который может быть перенесен лишь с помощью челночных систем. Этот обмен самым тесным образом связан с изменениями метаболической регуляции в клетке и ее окислительно-восстановительным потенциалом [505, 578].

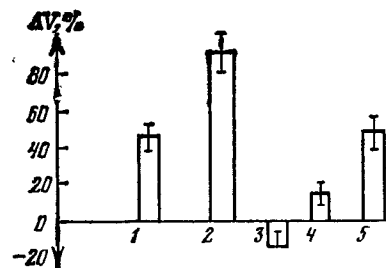
Существуют принципиальные различия в снабжении восстановительными эквивалентами окислительно-восстановительных реакций у животных, обладающих запасами гликогена в клетках печени (сытые животные) и после истощения этих резервов (24–48 ч голодания). В первом случае клетка обладает высоким содержанием глюкозо-6-фосфата [546], и реализация реакций гидроксилирования, требующая генерации НАДФН, сопровождается активацией пентозофосфатного шунта [546, 592]. При истощении запасов гликогена содержание глюкозо-6-фосфата в клетке падает [494–496] и генерация восстановленных эквивалентов становится преимущественно митохондриальной. Предполагается, что в качестве эндогенных субстратов при этом используются жирные кислоты. В этом случае необходим перенос H^+ из митохондрий во внемитохондриальное пространство.

Это заключение основывается на следующих фактах. Скорость окисления субстратов микросомальной системы подавляется различными ингибиторами дыхательной цепи в неравной степени. Так, ингибирование НАД-зависимого окисления ротеиноном снижало гидроксилирование алпренола на 61% у голодных и только на 24% у сытых животных; антимицин и KCN уменьшали этот же процесс соответственно на 81–75 и 20–14%; в присутствии разобщителя FCCP скорость гидроксилирования уменьшалась на 55 и 18% соответственно [190]. Аналогичные данные получены и в других работах [235, 240, 241].

Стимулированное амидопирином дыхание гепатоцитов

Рис. 36. Изменение скорости потребления кислорода в срезах печени

- 1 — при добавлении фурацилина в контроле;
- 2 — в присутствии НАДФН;
- 3 — у голодных животных;
- 4 — на фоне адреналина;
- 5 — у сытых животных на фоне адреналина



сытых животных в 3 раза больше, чем для гепатоцитов голодных животных. Сходная зависимость показана и для срезов печени, окисляющих фурацилин, сытых животных. Метаболизирование фурацилина срезами печени сытых мышей сопровождается стимуляцией потребления кислорода (рис. 36), а голодных — его подавлением сравнительно с исходным дыханием. Преинкубация срезов печени сытых животных с адреналином, активирующим гликогенолиз и, следовательно, истощающим эндогенные запасы гликогена в клетках печени и изменяющим место генерации восстановительных эквивалентов (модель «голодного среза»), резко уменьшает дыхательный ответ на добавление фурацилина сравнительно с контролем. Преинкубация срезов печени с НАДФН (1 мМ) увеличивает стимулированное фурацилином потребление кислорода в обоих случаях, однако относительная активация дыхания срезов голодных животных выражена значительно больше, чем сытых (в 40 раз и более в первом случае и только в 2 раза во втором) (см. рис. 36).

Таким образом, эффективность окисления субстратов системы гидроксилирования в случае образования внутриклеточного НАДФН через пентозофосфатный шунт выше, чем при поступлении восстановительных эквивалентов из дыхательной цепи митохондрий. Более того, ограничение ее работы у сытых животных ингибиторами дыхания не нарушает в определенных пределах способность клетки к реализации реакций микросомального окисления, а в ряде случаев даже усиливает ее (увеличение общего количества кислорода в связи с процессом окисления амидопирина). У голодных животных стимуляция потребления кислорода в ответ на добавление амидопирина как в присутствии ингибиторов дыхания, так и без них резко снижена либо вообще не наблюдается [416, 546].

Таблица 16. Влияние KCN и амитала на скорость образования формальдегида при окислении амидопирина в срезах печени мышей (% к скорости образования формальдегида в отсутствие ингибиторов)

Субстрат	KCN, $3 \cdot 10^{-3}$ М				Амитал, 10^{-3} М			
	Контроль		Фенобарбитал		Контроль		Фенобарбитал	
	Сы-тые	Го-лод-ные	Сы-тые	Го-лод-ные	Сы-тые	Го-лод-ные	Сы-тые	Го-лод-ные
Эндогенный	-27	-36	0	-52	+13	+100	-26	-26
Глюкоза (10 мМ)	+3	-55	0	-44	-3	-30	+4	-30

С этими данными согласуются результаты (табл. 16), полученные на срезах печени контрольных мышей и после 3-дневного введения фенобарбитала (80 м/кг).

Очевидно, что KCN на 40–50% подавляет процесс N-деметилирования амидопирина у голодных животных как с индуцированной, так и с неиндуцированной системой микросомального окисления. У сытых животных происходит либо ослабление эффекта KCN на скорость образования формальдегида, либо даже усиление реакций гидроксилирования. Т. е. в этих условиях могут проявляться конкурентные отношения между двумя редокс-цепями.

Качественно аналогичная картина отмечается для амитала. Из этих данных следует, что в условиях образования НАДФН за счет активности ГМФШ (сытые животные) дыхательная цепь может оставаться ответственной за некоторую часть микросомального окисления, т. к. ее ингибиторы снижают интенсивность реакций гидроксилирования, хотя и не так сильно, как у голодных животных.

Однако далеко не все субстраты в одинаковой степени способны участвовать в этом процессе. Роль субстратов ЦТК может меняться в связи с особенностями метаболизма субстрата микросомального окисления. Формальдегид — продукт окисления амидопирина — является субстратом дыхательной цепи. Это может определять специфику взаимодействия в данном случае микросомальной и митохондриальной редокс-цепей. Выше в табл. 11 было показано, что только сукцинат имеет явные преимущества для реализации N-деметилирования амидопирина срезами печени сытых интактных животных. Ни α -кетоглутарат, ни малат существенно не влияют на этот про-

Таблица 17. Стимулированное амидопирином (1 мМ) дыхание при различных условиях инкубирования срезов печени мышей (37° С, pH 7,4) (% к эндогенному)

Субстрат	Условия преинкубации, мин	Потребление O_2	Субстрат	Условия преинкубации, мин	Потребление O_2
Эндогенный	—	8	Сукцинат	25	60
α -кетоглутарат	10	5	»	10*	8
Малат	10	6	»	10**	16
Сукцинат	10	26			

* На фоне 1 мМ амитала.

** После преинкубации добавлено 10 мМ гидразинсульфата.

Примечание. Концентрация субстратов — 10 мМ. Эффект амидопирина регистрировался после добавления 0,8 мМ KCN.

цесс. Однако в условиях индукции ферментов микросомального окисления соотношения изменяются.

Согласно нашим данным, сукцинат играет особую роль в митохондриально-микросомальных отношениях. В пользу этого предположения свидетельствует много фактов, в том числе действие SKF-525A. В табл. 12 было продемонстрировано, что данный ингибитор примерно одинаково подавляет дыхание срезов печени. Однако, так как в присутствии сукцината скорость потребления кислорода значительно выше, чем при окислении других субстратов, абсолютная величина чувствительного к ингибитору дыхания значительно больше. Из этого следует, что и количество кислорода, связанного не с монооксигеназными реакциями, также больше.

Эффект сукцината можно было бы объяснить большей сравнительно с другими субстратами возможностью образования восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи и их последующим переносом в цитозольный компармент.

Если это так, то более длительное инкубирование препаратов в присутствии сукцината должно было бы усилить интенсивность этих реакций. И наоборот, ингибиторы переноса восстановительных эквивалентов (например, гидразинсульфат) должны подавить их. Проверка этого предположения полностью подтвердила его (табл. 17).

Амидопирин в присутствии сукцината стимулировал цианиднечувствительное дыхание значительно больше, нежели на фоне других субстратов. При более продолжительной преинкубации препарата с сукцинатом стимулированное амидопирином дыхание многократно усиливалось (до 60%) и практически полностью подавлялось на фоне амитала. Наконец, гидразинсульфат — ингибитор аспаратаминотрансферазы, ограничивающий в силу этого работу малатного шунта, значительно уменьшал стимулированное амидопирином дыхание, даже если был добавлен после преинкубации с сукцинатом.

В условиях сниженной активности ГМФШ существенная роль отводится также β -окислению жирных кислот в митохондриях [544]. Количество восстановительных эквивалентов, поставляемых в этом случае дыхательной цепью в цитозоль, оказывается достаточным для поддержания НАДФН-зависимой функции монооксигеназных реакций у голодных животных.

Во всех случаях, связанных с образованием восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи, встает вопрос об их переносе в цитозоль, так как мембрана митохондрий непроницаема для НАДН. Эта транслокация, как уже указывалось выше, связана с наличием челночных механизмов, наиболее реальными из которых являются реакции, включающие митохондриальную и цитозольную изоцитратдегидрогеназу, а также митохондриальную малатдегидрогеназу и малик-фермент [285, 505, 544, 546] (см. рис. 35). Это предположение основано на том, что в присутствии субстратов монооксигеназных реакций, вызывающих уменьшение внутриклеточного отношения свободных НАДФН/НАДФ⁺, происходит уменьшение отношения изоцитрат/ α -кетоглутарат. В соответствии со смещением равновесия в аконитазной реакции содержание цитрата также существенно уменьшается. Эти изменения происходят как в цитозольном, так и в митохондриальном компартментах, где в присутствии амидопирин имеют место уменьшение изоцитрата и цитрата и увеличение α -кетоглутарата. Значения редокс-потенциала для свободного НАДФН в цитозольном компартменте изменялись от -391 до -380 мВ в присутствии амидопирин, а в митохондриальном — от -407 до -400 мВ [505]. Таким образом, в печени митохондриальный пул НАДФН находится в более восстановленном состоянии, нежели цитозольный, как и было предсказано ранее [570]. Наиболее существенным является

резкое уменьшение концентрации цитрата в цитозоле (от 0,17 до 0,10 мМ), что предполагает его особую значимость в системе НАДФН-зависимых реакций. Вполне вероятно, что именно за счет этого снижения происходит подавление липогенеза, наблюдаемого при активации монооксигеназных реакций [547]. Именно поэтому цитрат включен в метаболическую схему митохондриально-цитозольного обмена восстановительными эквивалентами [505] (см. рис. 35).

НЕМИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ

Наличие НАДФН — цитохром с редуктазы (цитохром Р-450) показано в самых различных тканях млекопитающих: в гепатоцитах, надпочечниках, почках, легких, сердце, желудке, коже, семенниках, плаценте, лимфоцитах и др. Тем не менее существует выраженная специализация работы этих цепей в различных тканях. Так, в печени и легких наиболее активно протекает первая фаза окисления — восстановления ксенобиотиков, сродство к которым гидроксилазных ферментных систем значительно больше, чем, например, к ненасыщенным жирным кислотам.

Хорошо изученные реакции гидроксирования в корковом веществе надпочечников локализованы как в мембранах эндоплазматического ретикулума, так и в митохондриях. Специфическими субстратами для этих систем являются стероиды и анилиновые производные [487]. Существует тесное взаимодействие между цитохром Р-450 гидроксилазной и цитохромоксидазной системами митохондрий этой ткани. Обмен редуцирующими эквивалентами из одной цепи в другую осуществляется благодаря реакциям обратного переноса и трансгидрогеназной системе.

Однако имеются ткани, в которых цитохром Р-450 присутствует в следовых количествах (мозг, макрофаги) [229, 486]. Тем не менее НАДФН — цитохром с редуктаза в ткани мозга обладает высокой активностью и способна окислять эндогенные ненасыщенные жирные кислоты с образованием липидных перекисей [321, 486—488]. Вполне возможно, что именно этот процесс ответствен за величину ЦРД в ткани мозга, которая может достигать существенных значений (30—40% от исходного дыхания). Однако в отличие от печени она мало меняется у интактных животных в обычных условиях и практически не зависит от субстратов окисления, что говорит об отсутствии связи этой

Таблица 18. Изменение ЦРД в срезах мозга сытых животных (мыши) в условиях различного снабжения кислородом, % от исходного

Субстрат окисления	pO ₂ , мм рт. ст.		Субстрат окисления	pO ₂ , мм рт. ст.	
	60	25—30		60	25—30
Эндогенный	37	31	Амидопирин	30	17
Сукцинат	41	18	НАДФН	35	17
Глутамат	32	32	НАДФН + амидопирин	32	34
			Сукцинат + амидопирин	41	26

компоненты дыхания с реакциями гидроксирования (табл. 18).

И действительно, нами было показано, что реакции N-деметилирования амидопирина в срезах мозга не реализуются. В условиях сниженных значений pO₂ ЦРД никогда не увеличивается, как это имеет место в печени. Оно либо не меняется (окисление эндогенных субстратов, глутамата, НАДФН+амидопирина), либо снижается (в присутствии сукцината, амидопирина, сукцината+амидопирина, НАДФН).

Полностью отсутствуют данные о взаимодействии микросомальных и митохондриальных редокс-цепей в этом типе клеток, хотя полученные в нашей лаборатории данные позволяют предполагать возможность обмена восстановительными эквивалентами между ними через систему челночных механизмов аналогично тому, как это имеет место в печени.

Макрофаги (моноядерные фагоциты) так же, как и нервные клетки, содержат незначительное по сравнению с печенью количество цитохрома Р-450 (в 30 раз меньше) [229, 472], но обладают высокой активностью НАДФН-цитохром с редуктазы и НАДН-цитохром b редуктазы [292, 229]. Для них показана способность метаболизировать с очень невысокой скоростью полициклические углеводороды, усиливающаяся на фоне 3-метилхолантрена, и ацетилировать сульфаниламиды [140, 288, 474]. В нашей лаборатории Л. В. Мерцаловой было обнаружено, что перитонеальные макрофаги, прикрепленные к стеклу и сохранившие фагоцитарную и миграционную активность, имеют сравнительно высокое ЦРД (до 50%) при окислении сукцината, глутамата, глюкозы. Амидопирин незна-

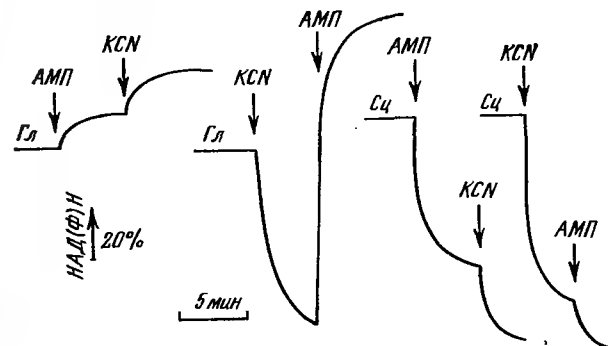


Рис. 37. Дыхательная реакция макрофагов на амидопирин

чительно стимулировал их дыхание на фоне глюкозы (рис. 37). Однако после частичного ингибирования дыхания KCN усиление потребления кислорода в ответ на добавление амидопирина становилось очень сильным и превосходило исходное дыхание на 60% и более. Аналогичная картина наблюдалась при окислении глутамата с малатом. В отличие от этого амидопирин на фоне сукцината всегда подавлял дыхание, даже если он добавлялся после KCN (см. рис. 37). Эти опыты свидетельствуют о том, что в макрофагах существует система немитохондриального окисления ксенобиотиков, которая работает более независимо от дыхательной цепи и конкурентно по отношению к ней, нежели в печени, что и позволяет обнаружить столь сильный O₂-стимулирующий эффект амидопирина в условиях ингибирования дыхательной цепи. Более того, в отличие от печени окисление амидопирина в макрофагах в присутствии сукцината, видимо, не может быть реализовано. Это связано с тем, что для данного типа клеток сукцинат не является адекватным субстратом.

РОЛЬ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ КЛЕТКИ

Биотрансформация ксенобиотиков — это тонко регулируемый процесс, зависящий от многих факторов, и прежде всего от функционального состояния организма. В качестве регуляторов активности ферментов, окисляющих ксенобиотики, могут выступать сами чужеродные соединения, способствуя индукции этих ферментов [219, 476] либо их

ингибированию [413]. Интенсивность окисления ксенобиотиков зависит от возраста индивидуумов. Она минимальна в эмбриональном периоде и увеличивается в постнатальном, достигая максимума лишь у взрослых животных [249, 503]. Исключение составляют приматы, у которых обнаружена способность печени плода метаболизировать ксенобиотики с достаточно высокой скоростью уже на ранних стадиях беременности.

Регулирование метаболизма ксенобиотиков находится под гормональным контролем организма [179], смысл которого продолжает оставаться неясным. Тем не менее известны половые различия в скорости окисления субстратов I типа у крыс [2, 323]. Как правило, более высокая способность к гидроксигированию у самцов крыс по сравнению с самками, развивающаяся параллельно половому созреванию, связана с андрогенной активностью [318] и отражает наличие различных популяций цитохрома Р-450 в микросомах у самок и самцов [318].

Активность процесса биотрансформации ксенобиотиков зависит от диеты, времени приема пищи, отличается у сытых и голодных животных [83]. Она резко нарушается под воздействием тяжелых металлов, алкилирующих соединений, радиации, гипероксии, а также под влиянием злокачественных перерождений.

В результате метаболизирования многих веществ могут образоваться эпоксидные продукты — потенциальные агенты химического канцерогенеза.

Все перечисленные факты показывают, какое важное значение имеет функциональное состояние организма для протекания процессов биотрансформации чужеродных соединений. Более того, активность этого процесса тесно связана с работой других электронтранспортных редокс-цепей в клетке. Этот последний момент имеет особое значение, так как знание механизмов взаимодействия различных метаболических путей открывает возможность для контроля и управления ими.

В настоящее время известно около 300 соединений, окисляющихся в эндоплазматическом ретикулуме печени. Поэтому вопрос об их метаболизме и взаимодействии при попадании в организм приобретает первостепенное значение. Активация окислительных систем, связанных с их превращениями, неизбежно влияет на другие электронтранспортные пути, расположенные в нем и в других мембранных образованиях в клетке, усиливая или ослаб-

ляя их, и в свою очередь, зависит от функционального состояния организма. Все это в совокупности определяет жизнь лекарственного вещества в организме, эффективность его действия, побочное влияние на другие функциональные и метаболические системы в клетке.

Одним из узловых моментов является вопрос о соотношении метаболизма ксенобиотиков с дыхательной цепью. Как было показано выше, их окисление в определенных условиях можно рассматривать как эндергонический процесс, поскольку он обеспечивается восстановительными эквивалентами, поступающими из энергозависимого митохондриального пула НАД(Ф)Н. В то же время промежуточные продукты метаболизма ксенобиотиков (да и они сами) могут являться ингибиторами дыхательной цепи. Многие низкомолекулярные гидрофобные соединения, являясь субстратами микросомальных оксидаз и оксигеназ, в то же время известны как эффективные ингибиторы дыхательной цепи, механизм действия которых обусловлен их специфическим гидрофобным связыванием с ферментом [67]. Однако известно, что их действие на митохондриальное дыхание в гепатоците или перфузируемой печени проявляется лишь при очень высоких концентрациях [116, 117] у обычных животных и может вообще не обнаруживаться либо оказывать стимулирующий эффект у феноталбурбитальных животных. Как уже демонстрировалось выше, для подавления дыхания срезов печени требуются значительно более высокие концентрации производных барбитуровой кислоты сравнительно со срезами миокарда или мозга. Аналогичное явление отмечали и другие авторы. Однако в присутствии SKF-525A, который эффективно конкурирует с другими лекарствами за связывание с цитохромом Р-450, гепатоциты становятся такими же чувствительными к ингибиторам дыхательной цепи (гексобарбиталу, пропранололу, алпренололу), как и изолированные митохондрии [210, 258, 261]. Следовательно, связывание этих веществ с цитохромом Р-450 [259, 440] в обычных условиях имеет защитную функцию против возможного токсического их действия. Благодаря этому ксенобиотики, введенные в организм в небольших концентрациях, очень быстро образуют комплекс с цитохромом Р-450, хотя скорость их метаболизирования — значительно более медленный процесс [2, 440]. Это подтверждается экспериментально. Действительно, концентрации барбитуратов, обеспечивающие полумакси-

мальное заполнение молекулы цитохрома Р-450, на 1–2 порядка ниже, чем концентрации, вызывающие ингибирование митохондриального дыхания [67]. Следовательно, окисление субстратов в митохондриях начинает подавляться тогда, когда микросомальная гидроксилазная система «загружена» в условиях высоких концентраций барбитуратов. Рассматриваемый механизм перестает действовать для ксенобiotиков с очень высокой степенью гидрофобности, т. е. таких, у которых сродство к митохондриальному ферменту выше, чем к микросомам.

большую теоретическую значимость и практический выход в медицину и требующую дальнейших фундаментальных исследований.

химатозных клетках печени, главным образом в реакциях, катализируемых АДГ, которая ответственна за конверсию этанола в ацетоальдегид (АцА) с одновременным восстановлением НАД в цитозоле в стехиометрическом отношении: 2 моля образованного НАДН на 1 моль утилизированного этанола. Метаболизм промежуточного продукта этой реакции АцА также протекает в клетках печени, где он служит субстратом целого ряда альдегиддегидрогеназ (АлДГ), локализованных как в цитозоле, так и в митохондриях [133, 217, 294, 454, 514]. Однако основным регулятором метаболизма АцА является, по-видимому, НАД-зависимый митохондриальный фермент АлДГ с низкой K_m (менее 10 мкМ), который ответствен за 80–90% его окисления в процессе метаболизма этанола [553], хотя его активность составляет всего 20–30% от общей активности АлДГ печени.

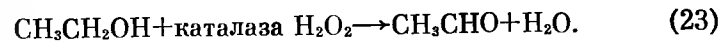
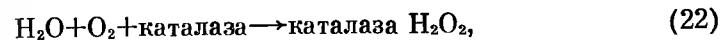
При однократном введении этанола в организм концентрации АцА колеблются в пределах 100–400 нМ [215] (физиологический уровень) и он окисляется в печени со скоростью примерно $12 \text{ нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка}$ (37°C) [267]. При этом он способен активировать дыхательную цепь митохондрий, значительно увеличивая скорость потребления кислорода изолированными митохондриями в состоянии 3, и дает коэффициент фосфорилирования $\text{АДФ/О} = 2,6$. Разобщители окислительного фосфорилирования ускоряют его окисление как *in vivo*, так и *in vitro* [131, 132, 216], а ингибиторы транспорта электронов в дыхательной цепи (ротенон и антимицин А) резко подавляют. Последнее свидетельствует в пользу того, что окислительный метаболизм АцА действительно связан с дыхательной цепью, реализуется через НАД-зависимый участок и сопряжен с окислительным фосфорилированием [363]. Однако в концентрациях, превышающих физиологические, проявляется токсический эффект АцА, выражающийся в подавлении митохондриального дыхания, уменьшении АДФ/О и стимулирующего влияния разобщителей [267, 396]. Аналогичный эффект наблюдается при хроническом введении этанола животным. Уменьшение энергозависимого потребления кислорода при этом связано с подавлением главным образом НАД-зависимого окисления [132, 483, 583, 613].

Возможность окисления этанола в независимых от АДГ реакциях впервые была продемонстрирована *in vitro*. Реальность их существования для переживающих клеток

была доказана в ходе многолетней дискуссии [129, 154, 359, 360, 477, 538, 545]. Наиболее важные экспериментальные результаты сводятся к следующему.

Для гепатоцитов и срезов в перфузируемой печени было найдено, что при высоких концентрациях этанола (больше 10 мМ) введение в инкубационную среду или перфузат ингибитора АДГ 4-метилпиразола не прекращало окисления этанола. При концентрации этанола 80 мМ скорость окисления, независимого от АДГ, составляла примерно $2 \text{ мкМ/г} \cdot \text{мин}$, что приблизительно равно общей скорости окисления этанола при его концентрации 5 мМ. Это означает, что потенциальная мощность окислительных путей, не связанных с АДГ, достаточно велика. Было доказано, что в зависимости от ситуации окисление этанола, не связанное с АДГ, может составлять от 20–25 до 50% от общего метаболизма этанола в intactных клетках [360, 558].

Способность каталазы катализировать *in vitro* окисление этанола была известна задолго до того, как вопрос о метаболических путях этанола в печени начал дискутироваться в научной литературе [328]. Поэтому естественно, что рядом исследователей [154, 477, 543, 548] было высказано предположение, согласно которому окисление этанола, наблюдаемое *in vitro* в микросомах, обусловлено «пероксидазной» активностью каталазы и включает следующие реакции:



Таким образом, реакции зависят от НАДФН, О_2 и микросомальных ферментов. Однако проверка возможности реализации этого предположения *in vivo* привела к противоречивым результатам. Согласно данным ряда авторов оказалось, что присутствие таких ингибиторов каталазной активности, как азид натрия, цианид и 3-амино-1,2,4-триазол, лишь незначительно изменяло скорость независимого от АДГ окисления этанола как в срезах печени, так и на уровне целого организма [128, 132, 360, 390]. В противоположность этому на гепатоцитах и перфузируемой печени показано, что некоторые из эффектов, возникающих при окислении этанола, полностью снимаются при совместном действии пиразола (ингибитора АДГ) и амина-

триазола (ингибитора каталазной активности). Это рассматривается авторами как свидетельство того, что именно каталазависимый путь окисления этанола является дополнительным к основному, АДГ-зависимому [492, 474, 548, 549].

Несколько лет назад удалось показать, что в микросомальной фракции имеется особая полиферментная система, способная *in vitro* к окислению этанола и не проявляющая каталазной активности, — микросомальная этанолюкисляющая система (МЭОС). Параллельно было показано, что реконструированная этанолюкисляющая система, состоящая из НАДФН, цитохрома Р-450, цитохром с редуктазы и синтетического фосфолипида — лецитина, тоже не обнаружила способности к каталазной активности [360, 538].

Установлено, что величины K_m для АДГ-зависимого окисления этанола и МЭОС существенно различаются (1–2 и 8 мМ соответственно) [360]. Имеются противоречивые данные относительно K_m для каталазной системы.

Существуют и другие косвенные соображения о роли МЭОС. Так, величина общей скорости генерации H_2O_2 , необходимой для катализируемого каталазой окисления этанола в печени при физиологических концентрациях субстрата, равна нескольким десяткам наномолей в 1 мин на 1 г. Эта величина соответствует лишь 1/10 независимого от АДГ окисления в печени. Даже в присутствии витамина K_3 , резко увеличивающего образование H_2O_2 и окисление этанола *in vitro*, не достигается скорость, обеспечивающая АДГ-независимое окисление. Было показано [390, 396, 558], что в условиях *in vivo* при высоких концентрациях этанола и блокировании АДГ увеличение скорости исчезновения этанола из крови соответствовало увеличению скорости его метаболизма МЭОС. Далее было установлено, что такие соединения, как бутанол, пропанол, которые не являются субстратами окисления для каталазной системы, окисляются МЭОС. В присутствии пиразола, ингибирующего АДГ, бутанол ингибировал пиразол-нечувствительное окисление в срезах печени, но не влиял на перекисный метаболизм этанола под воздействием комплекса каталаза — H_2O_2 [537]. Это указывает на то, что каталаза не участвует или мало участвует в пиразол-нечувствительной системе метаболизма этанола. Тот факт, что бутанол ингибирует не только пиразол-нечувствительное окисление этанола, но и МЭОС, также подтверждает участие последней в метаболизме этанола, не связанного с АДГ, так

как бутанол является хорошим субстратом для микросомальной системы детоксикации в печени.

Выяснение роли, которую в действительности играют каталазная и независимая от каталазы (МЭОС) этанолметаболизирующие системы микросомальной фракции гепатоцитов *in vivo* в физиологических условиях, продолжается исследователями, придерживающимися противоположных точек зрения.

В последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что окисление алкоголя может идти по пути, включающему его взаимодействие с гидроксильным радикалом $OH^\cdot$ [178], появляющимся в процессе Р-450-зависимого микросомального транспорта электронов. Как уже говорилось выше, Р-450-опосредованное окисление НАДФН ведет к образованию H_2O_2 , утилизируемой в процессе окисления этанола с помощью каталазы в пероксидазной реакции. Однако в присутствии ингибитора каталазы (азидата натрия) окисление этанола может существенно тормозиться веществами, способными к взаимодействию с $OH^\cdot$, например тиомочевинной, бензоатом, манитолом и диметилсульфоксидом. Более того, эти соединения оказывали больший ингибирующий эффект в присутствии азидата. Из всех указанных соединений-ловушек гидроксильных ионов только тиомочевина могла реагировать и с $OH^\cdot$ и с H_2O_2 и только это соединение уменьшало накопление H_2O_2 в присутствии азидата. В то же время тиомочевина не влияла на НАДН и НАДФН-цитохром с редуктазу, НАДН- и НАДФН-зависимое потребление кислорода, НАДФН-оксидазу. В дополнение к указанному выше это является косвенным подтверждением существования особого пути его окисления. Реальное участие подобных механизмов в метаболизме этанола в условиях *in vivo* еще предстоит выяснить. Сейчас уже несомненно, что тотальная скорость метаболизма этанола может контролироваться либо активностью АДГ, либо скоростью процессов, ответственных за редокс-состояние клетки [130, 217, 396].

Метаболические изменения, связанные с окислением АцАДГ, мало меняют отношение $НАД^+/НАДН$ в цитозоле [362] и значительно увеличивают его в митохондриях [217, 434, 483, 545]. Это можно объяснить, если предположить, что происходит реокисление НАДН, генерируемого в алкогольдегидрогеназной реакции в цитозоле при метаболизме этанола в низких концентрациях. Этот процесс сам по себе может зависеть от двух причин: 1) скорости

обмена восстановительными эквивалентами между митохондриями и цитозолом; 2) от потока электронов в дыхательной цепи или ее энергетического состояния, т. е. от скорости кислородзависимого реокисления НАДН. Именно потому, что при метаболизме этанола происходит изменение соотношения митохондриальной редокс-пары $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$, все наиболее существенные из наблюдаемых эффектов связаны с взаимодействием различных редокс-цепей клетки. В основе такого взаимодействия очень часто лежит обмен восстановительными эквивалентами между различными клеточными компартментами.

Как уже говорилось выше, перенос восстановительных эквивалентов в митохондрии для их последующей оксидации дыхательной цепью осуществляется с помощью особых «цепочных» механизмов и в данном случае главным образом через малатаспартатный и глицерофосфатный шунты.

Существенное значение для регуляции реокисления НАДН при поглощении этанола в изолированных гепатоцитах имеет природа косубстрата. В отсутствие искусственных электронных акцепторов для окисления цитозольного НАДН проникновение восстановительных эквивалентов в митохондрии регулируется субстратами шунтов. Суммарный поток эквивалентов в гепатоцитах оценивается в 500 мкМ для малатаспартатного и α -глицерофосфатного шунта и в 300 мкМ для одного малатаспартатного, т. е. потоки приблизительно равнозначны.

Включение малатаспартатного шунта для переноса восстановительных эквивалентов при окислении этанола в алкогольдегидрогеназной реакции подтверждается следующими фактами. Ингибиторы малатаспартатного шунта подавляют скорость окисления этанола. У голодных животных, у которых имеется низкое содержание в клетках печени субстратов-компонентов шунта (поэтому его активность ограничена), окисление этанола снижено сравнительно с сытыми животными. Добавление субстратов малатаспартатного шунта к изолированным гепатоцитам голодных животных восстанавливает скорость окисления этанола и мало влияет на этот процесс у сытых животных [129, 271, 592]. Антимидин подавляет окисление этанола в значительно большей степени, нежели ротенон. Это свидетельствует в пользу участия и α -глицерофосфатного шунта в транспорте восстановительных эквивалентов в направлении цитозол — митохондрии.

Действительно, субстраты, включающиеся в α -глицерофосфатный шунт, тоже стимулируют окисление этанола в гепатоцитах голодных животных и в значительно меньшей степени — в гепатоцитах сытых животных [129]. Следовательно, у голодных животных оксидация этанола регулируется внутриклеточной концентрацией субстратов-компонентов обоих шунтов, транспортирующих восстановительные эквиваленты в митохондрии. В этом случае активация транспорта электронов в дыхательной цепи разобщителями, так же как и его ингибирование антимидином А, меняет скорость потребления кислорода клеткой, но мало действует на скорость метаболизма этанола.

В зависимости от экспериментальных условий количественное участие каждой из цепочных систем может меняться. Так, у крыс с повышенным содержанием тиреоидных гормонов максимальная скорость окисления этанола была значительно ниже, чем в норме, несмотря на то что мощность α -глицерол-3-фосфатного цикла у гипертиреоидных животных существенно увеличена благодаря повышенному содержанию лимитирующего фермента цикла глицерол-3-фосфатоксидазы. Это объяснялось уменьшением активности АДГ в данном случае. У эутиреоидных животных в этих экспериментах интенсивность потока восстановительных эквивалентов для обеих систем оценивалась примерно одинаково [271]. У сытых животных, у которых нет дефицита во внутриклеточном содержании интермедиатов шунтов, окисление этанола активируется разобщителями, а ингибиторы транспорта электронов подавляют как дыхание, так и метаболизм этанола. Следовательно, в этом случае окисление этанола регулируется активностью дыхательной цепи митохондрий, ее способностью реоксидировать восстановительные эквиваленты, генерируемые в результате алкогольдегидрогеназной реакции [129, 483].

Регулирование процесса на уровне клетки в последнем случае можно представить следующим образом. Увеличение степени восстановленности НАД^+ в цитозоле приводит к ингибированию гликолиза на уровне глюкозо-3-фосфатдегидрогеназной реакции, в результате чего уменьшается немитохондриальная генерация АТФ, а так как АТФ-зависимые процессы не нарушены, увеличивается снабжение дыхательной цепи АДФ, которая и стимулирует реокисление восстановительных эквивалентов, связанное с потреблением до 60% кислорода от всего клеточного дыхания [362].

Восстановительные эквиваленты, поступающие из цитозоля в митохондрии, в результате этого процесса конкурентно подавляют поступление восстановительных эквивалентов, получаемых при окислении других субстратов (жирных кислот, субстратов ЦТК). Например, механизм влияния этанола на синтез жирных кислот в печени можно представить следующим образом: увеличение НАДН в цитозоле смещает равновесие в соотношении пируват-лактат, в результате чего в митохондриях уменьшается содержание пирувата, поступающего из цитозоля. Это затрагивает две реакции в митохондриях: синтез ацетил-КоА, идущий с помощью пируватдегидрогеназы, и карбоксилирование пирувата — реакцию, в ходе которой образуется оксалоацетат. Уменьшение последнего снижает уровень субстрата в митохондриях и цитоплазме и, следовательно, КоА в цитозоле, необходимого для синтеза жирных кислот, который естественно тормозится. Таким образом, нарушается нормальный метаболизм печени [495]. У животных, длительное время получавших этанол с пищей, наблюдаются значительные изменения в показателях общего метаболизма. Существенно увеличивается вес печени, отнесенный к общему весу тела (приблизительно на 50%). Скорость потребления кислорода гепатоцитами увеличивается *in situ* и *in vitro* на 20—40%, а в пересчете на общий вес тела до 80%. Скорость метаболизма самого этанола также возрастает на 30—70%.

Есть основания предполагать, что вообще адаптивная перестройка метаболизма в печени животных, хронически получающих этанол, осуществляется опосредованно, через изменение режима работы кислородопотребляющих систем в целом. Так, при увеличении скорости биосинтетических процессов, сопутствующем алкоголизму, соответственно растет расход цитозольного АТФ, что, в свою очередь, повышает концентрацию АДФ в цитозоле и увеличивает его перенос с помощью адениннуклеотид транслоказы в митохондриальное пространство. Этот поток АДФ и стимулирует потребление кислорода, наблюдаемое в эксперименте [331а].

Убедительной демонстрацией тесной связи между гепатотоксическим действием этанола и условиями работы системы дыхания клетки является резкое увеличение гепатоклеточного некроза у крыс линии SH, получавших алкоголь в условиях гипоксии, по сравнению с контрольной группой животных, подвергшихся тому же гипоксическому воздей-

ствию. Биохимические изменения, индуцируемые этанолом, делают печень более чувствительной к гипоксии, так как возникающий дефицит кислорода при повышении расхода АТФ в цитозоле и концентрации АДФ в митохондриях ведет к необратимым нарушениям регуляции энергетического обмена в клетке [298а].

Изменение соотношения НАД⁺/НАДН в АДГ-зависимых реакциях обуславливает влияние метаболизма этанола на работу цикла Кребса. Это было ярко выражено при окислении α -кетоглутарата, так как увеличение НАДН ингибирует α -КТДГ [132, 434]. В меньшей степени этанол действовал на превращение сукцината в изоцитрат.

Действие этанола на редокс-состояние клетки, с одной стороны, и участие НАДФН-зависимой ферментной системы в окислении этанола — с другой, предопределяет возможность взаимовлияния метаболизма этанола и ксенобиотиков. *In vitro* показано, что этанол оказывает ингибирующее действие на цитохром Р-450-зависимое окисление ксенобиотиков в микросомальной фракции гепатоцитов. Надо отметить, что до сих пор не ясно, в какой степени сказывается это ингибирующее действие этанола при высоких концентрациях в условиях *in vivo*.

Найдено, что этанол ингибирует метаболизм амидопирина, анилина, фенobarбитала *in vitro* и мепробромата, толбуамида [131, 408, 462, 501] *in vivo*. Механизм ингибирующего действия этанола *in vivo* до сих пор не ясен и нельзя исключить наличия некоторого неспецифического взаимодействия этанола с микросомальным гемопротенином, в результате которого и происходит уменьшение скорости гидроксирования ксенобиотиков.

Установлено, что этанол связывается с цитохромом Р-450. Однако величина K_m для этой реакции равна ~100 мМ, что значительно превышает физиологически допустимые концентрации этанола в печени. Это говорит о том, что в интактной печени ингибирующее лекарственный метаболизм действие этанола обусловлено не только его связыванием с Р-450, но в большей степени с опосредованным влиянием на работу НАДФН-зависимой ферментной системы микросомального окисления. Так, например, 50%-ное ингибирование О-деметилирования п-нитроанизола наблюдалось для изолированных микросом при концентрациях этанола 130 мМ, а для перфузируемой печени — 2÷5 мМ. Если же пересчитать в последнем случае концентрацию на микросомальный белок, то соответствующую

щая величина концентрации станет еще меньше — около 1 мМ. Это является серьезным указанием на принципиальные различия в механизмах ингибирования. В то же время бутанол — алкоголь, не являющийся субстратом для АДГ, в отличие от этанола не ингибировал метаболизм п-нитроанизола и не изменял уровень восстановленности пиридиннуклеотидов в перфузируемой печени.

Ясно, что в данном случае действие этанола на метаболизм экзогенных соединений не является прямым, а осуществляется в результате АДГ-зависимого окисления этанола. Уменьшение отношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$, возникающее при метаболизме этанола, катализируемом АДГ, приводит к изменениям в цитоплазматическом редокс-состоянии, что, в свою очередь, неблагоприятно сказывается на метаболизме ксенобиотиков в гепатоцитах [474]. Результатом этого может быть ингибирование и цикла Кребса, и β -окисления жирных кислот, и последующего опосредованного уменьшения транспорта восстановительных эквивалентов из митохондриального пространства в цитозоль, что во многом определяет работу НАДФН-зависимых систем окисления. Кроме того, увеличение митохондриального НАДН непрямым образом может сказаться на скорости генерации НАДФН в пентозофосфатном цикле [272].

Аналогичным примером непрямого действия этанола на метаболические процессы может служить его ингибирующий эффект на конъюгацию п-нитрофенола в изолированных гепатоцитах [413]. Уменьшение отношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в данной ситуации приводит к ингибированию глюкуронидации на 40–50%.

Эффект этанола был примерно одинаков в широком диапазоне высоких его концентраций (10–100 мМ), и ингибирующее глюкуронидацию действие этанола отразилось при добавлении 4-метилпиразола — ингибитора АДГ. Интересно, что максимальный ингибирующий эффект возникал при концентрации ≈ 6 мМ, которая близка к K_m АДГ-зависимого метаболизма этанола. В изолированных микросомах при таких концентрациях действие этанола не проявлялось.

Установлено, что сами продукты окисления этанола — ацетальдегид и ацетат — не влияют на глюкуронидацию вплоть до сравнительно высоких концентраций — 1 мМ. Эти факты свидетельствуют, что ингибирующее влияние этанола на процесс глюкуронидации п-нитрофенола (а также некоторых других субстратов — 2-нафтола, фенолфталеи-

на) происходит не непосредственно, а через ингибирование синтеза глюкуроновой кислоты. Косвенным подтверждением этого вывода является то, что лактат и сорбитол, также увеличивающие цитоплазматическое отношение $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$, имеют сходное действие на процесс глюкуронидации. Этот эффект может иметь большую значимость в условиях *in vivo*, так как максимальное ингибирование возникает при физиологических концентрациях этанола [413]. В свою очередь, это означает, что хроническое поглощение этанола может не только тормозить процесс конъюгации ксенобиотиков, но и оказывать подавляющее действие на окисления эндогенных субстратов, таких, как билирубин и стероиды.

Следует сказать еще об одном непрямом действии этанола на кислородзависимые процессы: он ингибирует АТФазную активность и таким образом влияет на соотношение АТФ/АДФ в клетке, которое, как показано выше, участвует в регуляции скорости дыхания. Механизм этого ингибирования также не вполне ясен, но, очевидно, связан с влиянием алкоголя на физико-химические свойства плазматической мембраны, а также с его непосредственным взаимодействием с АТФазой [315, 361]. Кроме того, существует предположение, что само окисление этанола опосредованно регулируется скоростью АТФ-зависимых процессов: уменьшение содержания АТФ вызывает увеличение скорости поглощения кислорода, это приводит к увеличению скорости окисления НАДН в митохондриях, что, в свою очередь, повышает скорость метаболизма этанола [613]. По существу, таким же образом можно представить себе ингибирующее влияние оубаина на окисление этанола. Его действие уменьшает скорость дыхания митохондрий, затем уменьшается скорость реокисления НАДН и, наконец, скорость окисления этанола [502].

В определенной ситуации лимитирующим фактором в метаболизме этанола может стать сама дыхательная цепь. Это было показано на изолированных гепатоцитах, полученных от печени сытых животных, когда ингибиторы митохондриального дыхания и малатаспартатного шунта не снижали ускорения окисления этанола, возникающего из-за предварительного хронического его введения. Скорость метаболизма резко возрастала при добавлении субстратов шунтов вместе с 2,4-динитрофенолом — разобщителем окислительного фосфорилирования, но не в его отсутствие. Это можно объяснить, если предположить, что ускорение

дыхания при внесении разобщителя увеличивает скорость окисления этанола [216, 558].

Особый интерес для выяснения закономерностей, описывающих взаимодействие редокс-цепей в клетке, представляет взаимосвязь процессов окисления этанола и углеводов в связи с тем, что энергетика превращений, происходящих в последнем случае, сравнительно хорошо изучена.

Большой цикл работ по выяснению механизма стимулирующего действия фруктозы на метаболизм этанола был проведен на перфузируемой печени и изолированных гепатоцитах сытых и голодных крыс [383, 452, 492, 496, 613].

На перфузируемой печени было показано, что стимуляция окисления этанола в этом случае может быть обусловлена увеличением производства энергии при образовании метаболитов фруктозы. Как уже говорилось, два процесса могут лимитировать наблюдаемое ускорение метаболизма этанола — транспорт восстановленных эквивалентов в митохондрии с последующим реокислением НАДН и поток электронов через дыхательную цепь.

У голодных крыс скорость переноса восстановительных эквивалентов из цитозоля в митохондрии (судя по скорости окисления АцА) была приблизительно равна скорости накопления продуктов промежуточного метаболизма фруктозы. В то же время увеличение пула митохондриального НАДН было прямо пропорционально изменению содержания АТФ, связанному с окислением фруктозы. Все эти факты говорят в пользу того, что стимулирующий эффект фруктозы на метаболизм этанола у голодных крыс связан с ее влиянием на работу дыхательной цепи митохондрий. В пользу этого же свидетельствует факт, что скорость стимулированного фруктозой окисления этанола в гепатоцитах голодных крыс мало зависела от содержания субстратов малатного шунта и была выше, чем у сытых животных. Межкомпартментальный перенос восстановительных эквивалентов у голодных крыс не является лимитирующим звеном этого феномена, а максимальная скорость НАД-зависимого окисления этанола в печени у голодных животных определяется активностью дыхательной цепи. В отличие от этого у сытых животных активация окисления этанола фруктозой связана главным образом с переносом восстановительных эквивалентов из цитозоля с помощью α -глицерофосфатного шунта.

Состояние систем транспорта и реокисления восстано-

вительных эквивалентов, по-видимому, определяет изменения в метаболизме этанола в ответ на введение экзогенного лактата. Можно было ожидать, например, что последний будет тормозить скорость окисления этанола в связи с генерацией цитоплазматического НАДН и конкуренцией за свободный НАД цитозоля. Однако лактат стимулирует оксидацию этанола [186], что связано с увеличением концентрации субстратов малатаспартатного шунта.

Различием в содержании субстратов этого шунта в клетках печени *in vivo* и *in vitro* объясняется существенная разница в величинах скорости окисления этанола в печени целого организма (2,4–4 мкМ/мин·г) и в изолированных гепатоцитах (0,7–0,9 мкМ/мин·г) [186]. *In vitro*, когда процедура изоляции клеток приводит к потере части субстратов шунта, скорость переноса восстановительных эквивалентов с его помощью становится лимитирующей стадией окисления этанола в гепатоцитах печени и голодных и сытых крыс [129].

Несмотря на интенсивные исследования и большой экспериментальный материал, реальная значимость МЭОС и каталазависимых путей окисления этанола в условиях *in vivo* остается невыясненной. Тем не менее достоверные доказательства работоспособности этих систем в условиях *in vitro* свидетельствуют о том, что все они участвуют в метаболизме алкоголя. В то же время есть веские основания полагать, что сложность и неоднозначность ответа на любое внешнее воздействие, с одной стороны, и разнонаправленное влияние самого этанола на общий метаболизм клетки — с другой, связаны в конечном счете с изменением редокс-состояния как митохондриального, так и цитозольного компартментов.

Окисление этанола в клетке является наглядным примером того, какие сложные отношения могут складываться при метаболизме того или иного вещества, окислительно-восстановительные превращения которого связаны с воздействием на клеточный пул пиридиннуклеотидов.

* * *

Микросомальная система окисления является мощным потребителем кислорода и может быть ответственной за 10–40% его утилизации от общего количества, связанного с клеточным дыханием. Эта часть дыхания цианидрезистентна, так же как и некоторые другие кислородзависимые процессы.

Вклад микросомального окисления в клеточное дыхание — величина лабильная, меняющаяся в зависимости от субстрата окисления, функционального состояния клетки и др.

Активность системы микросомального окисления может поддерживаться в определенных условиях восстановительными эквивалентами, поступающими из дыхательной цепи, однако ограничение работы последней не нарушает в определенных пределах способность клетки к реализации монооксигеназных реакций. Сукцинат играет особую роль в микросомально-митохондриальных отношениях, поставляя восстановительные эквиваленты в цитозоль в высокоэнергетическом состоянии и способствуя тем самым активации реакций микросомального окисления. Однако в условиях ограничения транспорта электронов через терминальный участок дыхательной цепи (острая гипоксия) этот его эффект не проявляется.

В зависимости от метаболического и функционального состояния клетки обмен восстановительными эквивалентами между митохондриями и цитозолем может быть бинаправленным. Поток восстановительных эквивалентов из цитозоля в митохондрии устанавливается при окислении этанола. Общим итогом таких реакций является регулирование уровня внутриклеточного редокс-потенциала.

4. ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ИХ РОЛЬ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

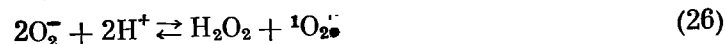
Помимо восстановления кислорода в системе дыхательной цепи митохондрий, связанного с образованием воды, возможно его двух- и одноэлектронное восстановление. Продуктом двухэлектронного восстановления является перекись водорода:



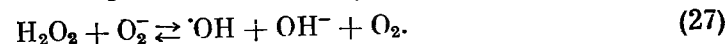
Одноэлектронное восстановление приводит к появлению свободного радикала — супероксидного аниона (O_2^-), имеющего дополнительный электрон.



При определенных условиях неэнзиматическая дисмутация O_2^- может продуцировать еще одно электронно-возбужденное состояние кислорода, отличающее его от основного внутримолекулярной перестройкой электронов и обладающее наиболее высоким энергетическим уровнем, — синглетный кислород ($^1\text{O}_2$):



Наконец, супероксидный анион может реагировать с перекисью водорода и образовывать высокоактивный гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) (реакция Харбер—Вейсса):



В биологической системе такая реакция возможна в присутствии хелатных ионов металлов (например, феррицитохрома) [263а] и инициируется триптофаном. В настоящее время известно более десяти ферментов, локализованных в различных компартментах клетки, которые могут катализировать эти реакции (табл. 19). Продукты восстановления молекулярного кислорода отличаются высокой активностью, что делает особо значимым вопрос об их роли в жизнедеятельности клетки.

ОБРАЗОВАНИЕ H_2O_2 В КЛЕТКЕ

Возможность прямого переноса водорода к O_2 с последующим образованием перекиси водорода в интактной клетке дискутируется уже на протяжении более чем полувека. С альтернативными концепциями выступали Бах, Танберг, Виланд, Виллштеттер, Варбург, Кейлин и др. Виландом и Митчелом в свое время (1925—1932 гг.) развивалась теория активации субстратов, в результате чего могли создаваться условия для прямого соединения водорода субстрата с кислородом и образования H_2O_2 в живых системах. В противовес этой точке зрения Варбург выдвинул концепцию активации молекулярного кислорода (1923—1924 гг.) и, приняв схему Кейлина переноса электронов в цитохромной цепи, предположил возможность его восстановления за счет соединения с водородом в терминальном участке дыхательной цепи с образованием воды. Открытие ими цитохром с оксидазы и описание ее свойств как СО- и цианидчувствительного фактора и катализатора потребления кислорода в дыхательной цепи отвлечло на

Таблица 19. Некоторые ферменты, продуцирующие H_2O_2 (1)
 O_2^- (2), и 1O_2 (3) и их субклеточная локализация (по [450, 504])

Фермент	Субклеточная локализация	Образующийся продукт
Гликолатоксидаза	Пероксисомы	1
L- α -гидрокислая оксидаза	»	1
L-гулонолактоноксидаза	—	1,2
Альдегидоксидаза	—	1,2
Ксантиноксидаза	Цитозоль	1—3
D-оксидаза аминокислот	Пероксисомы	1
Моноаминоксидаза	Наружная мембрана митохондрий	1
Пиридоксаминооксидаза	—	1,2
Диаминоксидаза	Эндоплазматический ретикулум	1,2
НАДФН-цитохром C редуктаза	То же	1—3
НАДН-цитохром C редуктаза	—	1—3
Уратоксидаза	«Тело» пероксисомы	1
Супероксиддисмутаза	Цитозоль, матрикс митохондрий	2
Галактозооксидаза	—	1,2
Триптофанпирролаза	—	2
Простагландинсинтетаза	—	1,3
Дигидрооротатдегидрогеназа	Митохондрии	1,2

несколько десятилетий внимание ученых от исследований реакций одно- и двухэлектронного восстановления кислорода. Изучению условий их протекания в живой системе долгое время мешало также отсутствие адекватных методов определения конечных продуктов. Так, например, благодаря тому, что скорость разложения перекиси водорода после гибели животного очень высока, Вилланду вообще не удалось идентифицировать ее в тканях.

Однако существование значительных колебаний чувствительности дыхания митохондрий, изолированных из клеток эукариотов, к цианиду и антимицину А [515], а также бактерий и митохондрий высших растений [365], не могло быть понято в рамках схемы Варбурга—Кейлина и объяснено особенностями взаимодействия ингибиторов с компонентами дыхательной цепи. У некоторых растений величина ЦРД очень велика и может составлять 60—95%

от общего дыхания [99, 145], что предполагает существование путей восстановления кислорода, альтернативных основной дыхательной цепи. Действительно, связь между величиной антимициннечувствительного дыхания и образованием перекиси водорода была недавно подтверждена на митохондриях животных и растительных организмов [110, 112].

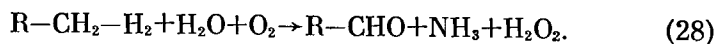
Способность митохондрий продуцировать H_2O_2 была предсказана сравнительно давно [13, 53, 54, 138, 283, 306]. Однако долгое время существовали опасения, что получаемые результаты являются артефактом выделения частиц. В 1971 г. Чанс, Опино и Лошен [152, 377] показали, что субстраты митохондриального окисления, разобщители и ингибиторы дыхательной цепи являются модуляторами уровня промежуточного продукта каталазы (каталаза- H_2O_2 , или комплекс I) в пероксисомально-митохондриальной фракции печени крыс. В том же году была продемонстрирована способность митохондрий сердца голубя генерировать H_2O_2 [55, 112, 372, 374]. Скорость ее образования прямо зависела от метаболического состояния и могла достигать 15% от общей ее продукции клеткой [160]. При физиологических условиях генерация H_2O_2 была максимальной в контролируемом состоянии 4 [55—57, 110, 112, 374], т. е. в условиях отсутствия акцептора фосфата и высокой степени восстановления компонентов дыхательной цепи. В присутствии НАД-зависимых субстратов или сукцината митохондрии печени крыс и сердца голубя в состоянии 4 генерируют примерно 0,3—0,6 нмоль H_2O_2 /мин·мг белка [112, 114, 428], что соответствует потреблению 2—4% кислорода от общего дыхания частиц в этом состоянии [143].

Образование H_2O_2 в изолированных митохондриях усиливается в несколько раз в присутствии антимицина А и сопряжено со значительной активацией утилизации кислорода [112, 143, 374]. Оно ингибируется ротеноном и амиталом в случае окисления НАД-зависимых субстратов [112—114]. Аналогичные результаты получены для протозоа и митохондрий растений [115]. Снижение образования H_2O_2 наблюдается также в состоянии 3 и в присутствии разобщителей, когда дыхательные переносчики были значительно более окислены [55—57, 109, 112, 114, 372]. Таким образом, интенсивность митохондриальной генерации H_2O_2 определяется работой дыхательной цепи в целом и степенью восстановленности дыхательных переносчиков

на участке, локализованном между ротенон- и антимицинчувствительными участками.

Субмитохондриальные частицы сердца крысы и быка также являются эффективными источниками H_2O_2 [110, 283, 371, 373]. Так как эти частицы свободны от аутооксидабельных дегидрогеназ (например, флавопротеидов), то образование перекиси водорода действительно непосредственно связано с компонентами дыхательной цепи, имеющими потенциал, близкий к нулю (сукцинатдегидрогеназа, убихинон, цитохром b, железосерные центры комплекса сукцинатдегидрогеназа — цитохром b). Таким образом, изопотенциальная группа переносчиков дыхательной цепи, находящаяся между ротенон- и антимицинчувствительными участками, реагирует в восстановленной форме с молекулярным кислородом и продуцирует H_2O_2 [109, 114, 210, 371, 374]. За прямое образование H_2O_2 в дыхательной цепи митохондрий ответственна одна из восстановленных форм убихинона — убихинол (QH_2) [111]. Большая же часть перекиси водорода является продуктом дисмутации O_2^- , образованного при аутооксидации семинубихинона ($\text{QH}^\bullet$) и цитохрома b_{566} [111, 124] (см. ниже).

Определенное количество H_2O_2 образуется в процессе окислительного дезаминирования моноаминов, в том числе таких биологически активных, как норадреналин, адреналин, дофамин, серотонин, триптамин и тирамин. Этот процесс катализируется системой ферментов, известных под общим названием моноаминоксидазы, локализованной на наружной мембране митохондрий, и протекает по общей схеме [292a]:



В пероксисомах различных органов, и в первую очередь печени, образуется до 45% H_2O_2 от общего ее количества в клетке при $p\text{O}_2 = 159$ мм рт. ст. и окислении соответствующих субстратов. Эти субклеточные органеллы содержат целый ряд H_2O_2 генерирующих ферментов, в том числе некоторые флавопротеиды, оксидазу Д-аминокислот, L- α -гидроксиоксидазу, оксидазу жирного ацил-КоА и у неprimатов — медьсодержащий фермент уратоксидазу [388, 488]. Недавно к этому списку добавлено пальмитил-КоА-зависимое образование перекиси водорода [355].

Гиполипидемические вещества, увеличивающие количество пероксисом в печени, усиливают скорость паль-

митил-КоА оксидации в 11–18 раз. Таким образом, жирные кислоты являются, видимо, важным потенциальным субстратом пероксисом. В перфузируемой печени также показана возможность генерации H_2O_2 при окислении длинноцепочечных жирных кислот [443]. Главным субстратом пероксисом печени крыс является мочевиная кислота, которая непрерывно образуется в пуриновом цикле, и ее концентрация в цитозоле составляет 70–100 мкМ [114, 202]. В изолированных пероксисомах каталаза разрушает большую часть образованной в уратоксидазной реакции перекиси водорода. Однако 11–42% ее диффундирует во внешнюю среду [114]. Имеет ли место этот процесс в интактной клетке — неизвестно.

Образование H_2O_2 в *эндоплазматическом ретикулу*ме было впервые показано в 1957 г. [248] во время аэробной инкубации микросом печени с НАДФН и затем подтверждено в более поздних работах [114, 281, 543]. Наиболее вероятные ее источники — флавопротеид НАДФН-цитохром с (P-450) редуктаза [387] и аутооксидация цитохрома P-450 [281, 543]. НАДФН-зависимое образование перекиси водорода связано с оксидазной активностью эндогенного НАДФН:



Реакция свидетельствует о том, что потребление кислорода, окисление НАДФН и образование продукта реакции H_2O_2 находятся в стехиометрическом отношении 1:1:1 [182].

У фенотарбитальных животных до 50% кислорода, используемого при оксидации микросомами НАДФН в отсутствие экзогенных субстратов, связано с образованием перекиси водорода [222, 223, 585] и может составлять до 35% от общего ее количества в клетке. Скорость ее генерации у контрольных и фенотарбитальных животных в присутствии НАДФН составляет 6–15 нмоль/мин·мг белка [114, 281]. НАДН менее эффективен в образовании H_2O_2 [585]. В присутствии эндогенной каталазы скорость образования H_2O_2 снижена за счет ее деструкции ферментом каталазой и сопутствующей регенерацией кислорода.

Активация реакций гидроксилирования также сопровождается образованием H_2O_2 . Этот процесс чувствителен к CO , что предполагает участие цитохрома P-450 в образовании перекиси водорода [222, 223, 508, 511].

В настоящее время обсуждаются два возможных механизма образования перекиси водорода во время активации цитохрома Р-450 [218, 222]. Первый может быть связан с диссоциацией супероксидного аниона на стадии одноэлектронного восстановления тройного комплекса цитохром Р-450—кислород—субстрат. Его дисмутация может вести к прямому образованию перекиси водорода. Второй механизм может включать протонацию и диссоциацию пероксидного аниона на стадии предполагаемого двухэлектронного восстановления тройного комплекса цитохром Р-450—кислород—субстрат. Однако отсутствие синергического эффекта при добавлении НАДН на НАДФН-зависимое образование H_2O_2 делает более вероятной гипотезу образования перекиси водорода за счет дисмутации супероксидных анионов, которые генерируются при декомпозиции оксигенированного феррокомплекса цитохрома Р-450 [222, 223, 585].

Имеется очень мало данных об образовании H_2O_2 в эндоплазматическом ретикулуме интактных клеток [114, 281, 543]. Однако они подтверждают возможность образования перекиси водорода в процессах аутооксидации [506—508].

Энзимы цитозоля (ксантиноксидаза, альдегидоксидаза) также образуют перекись водорода, хотя их активность не очень велика (до 5% продукции H_2O_2 от общего ее количества, генерируемого в клетке) [114]. Оценить активность этих систем в физиологических условиях пока не удалось.

ИСТОЧНИКИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ КИСЛОРОДА В КЛЕТКЕ

Супероксидный анион является стехиометрическим предшественником перекиси водорода в клетке:



Главными его источниками служат мембраносвязанные полиферментные системы митохондрий и микросом, содержащие флаavin и железосерные белки [238, 269, 386, 406]. Небольшое его количество продуцирует ферменты цитозоля ксантиноксидаза и альдегидоксидаза [238, 239]. Он может также образовываться в реакциях аутоокисления катехоламинов, ферридоксинов, гемопротеинов [450]. Вза-

имодействуя с H_2O_2 (реакция 27), он может способствовать образованию еще более активных свободных радикалов, например гидроксильного, а в определенных условиях приводить к образованию синглетного кислорода.

Митохондриальные мембраны печени могут продуцировать до 24 нмоль O_2^- /мин·мг белка ткани [114] и, видимо, являются одним из главных физиологических источников супероксидных анионов, большинство из которых с помощью фермента супероксиддисмутазы конвергирует в H_2O_2 (реакция 30), поддерживая стационарную концентрацию O_2^- внутри митохондрий, равную $8 \cdot 10^{-12} M$ или несколько выше [557]. Так как на участке сукцинатдегидрогеназы—цитохром b в дыхательной цепи происходит переход от двух- к одноэлектронному переносу, можно ожидать, что место генерации O_2^- локализовано именно здесь. Действительно, отмытые субмитохондриальные частицы, т. е. не содержащие супероксиддисмутазы, в присутствии сукцината или антимицина А генерируют от 4 до 7 нмоль O_2^- /мин·мг белка, что дает отношение O_2^-/H_2O_2 , равное 1,5—2,1 [109—111, 198, 373, 374, 428].

НАДН-убихинон редуктаза и убихинон-цитохром с редуктаза, имеющие убихинон в качестве общего главного компонента, генерируют O_2^- со скоростью, на два порядка превышающей эффективность его образования сукцинатдегидрогеназой [109, 111]. В случае НАДН-убихинон редуктазы продукция подавляется ротеноном [124].

Предполагается, что ответственной за одновалентное восстановление кислорода в неэнзиматических реакциях митохондрий является главным образом аутооксидация свободнорадикальной формы убихинона — убисемихинона ($QH^\cdot$) [124]:



Интенсивность образования O_2^- при этом зависит от характера взаимодействия убихинона с цитохромами b и c и сукцинатдегидрогеназой, определяющего, в частности, количество $QH^\cdot$. В равновесной системе эта неэнзиматическая реакция протекает с невысокой скоростью ($k=40 \text{ м}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) [111]. Цитохром b_{558} также является донором O_2^- [371], но его роль в этом процессе по сравнению с восстановленными формами убихинона менее существенна. Имеются данные в пользу того, что молекулярным механизмом, регулирующим образование O_2^- и H_2O_2 , может

быть мембранный потенциал. Его блокирование увеличивает образование убисемихинона и тем самым продукцию O_2^- [124].

Наконец, не исключается возможность образования O_2^- другими аутооксидабельными ферментами митохондрий, например дегидрооротатдегидрогеназой [234]. Однако в сравнимых условиях восстановленные формы убихинона значительно более активно генерируют супероксидный анион [114].

До 80% от общего количества O_2^- используется в реакции дисмутации (реакция 30) катализируемой мембрано-связанной СОД в матриксе митохондрий. Остальные 20% мигрируют в пространство цитозоля [428, 429]. Эта фракция может включаться в инициацию свободнорадикальных цепных реакций, взаимодействуя с метиленовыми мостиками полиненасыщенных жирных кислот (перекисное окисление липидов).

Данные о возможности образования O_2^- в пероксисомах отсутствуют [160, 388].

Однако изолированные микросомы генерируют сравнительно высокие количества супероксидного аниона (2–10 нмоль/мин·мг белка) [96, 222, 223, 405]. Главными его источниками в мембранах эндоплазматического ретикула являются флавопротеид НАДФН-цитрохром с редуктаза и аутооксидация цитохрома Р-450 [281].

Как уже указывалось, энзимы цитозоля ксантиноксидаза и альдегидоксидаза также продуцируют некоторое количество O_2^- [238, 239].

Ядерная фракция асцитных опухолевых клеток содержит флавины и цитохромы [95]. Для нее же показано наличие электронтранспортной редокс-цепи микросомального типа [95]. Дыхательная активность этой фракции сопровождается образованием O_2^- со скоростью 3,2 нмоль/мин·мг белка, а также перекиси водорода [96]. В ней обнаружена высокая активность СОД [96].

Согласно реакции 27, образование O_2^- создает условия для генерации синглетного кислорода (1O_2). Из табл. 19 видно, что во многих случаях активность ферментов, катализирующих образование O_2^- и H_2O_2 , действительно сопровождается появлением 1O_2 . В настоящее время получены прямые подтверждения того, что образование последнего включается в качестве обязательного этапа в «дыхательную вспышку» фагоцитирующих и некоторых других клеток (регистрация хемилюминесцентной вспыш-

ки при переходе синглетного кислорода в основное состояние) [82, 86–88, 315а, 392, 423–425, 450, 456, 471].

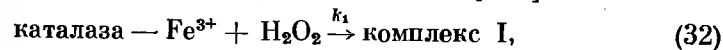
Возможность образования гидроксильного радикала ($^{\bullet}OH$) в условиях *in vivo* показана для флавино-содержащих ферментов [386], а также в реакциях, катализируемых железом и суммарно описываемых уравнением Харбер–Вейсса (реакция 27).

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Перекись водорода, супероксидный радикал и другие активные метаболиты кислорода являются нормальными продуктами жизнедеятельности клетки. В то же время известно, что они обладают токсическим эффектом. Поэтому организация системы регулирования их содержания является принципиальным моментом в жизнедеятельности клетки. Эта концентрация находится под физиологическим и биохимическим контролем, а также модулируется снабжением субстратами и кислородом.

Главным ферментом, связанным с метаболизмом H_2O_2 , является каталаза. Трудно найти ткань, где бы этот фермент отсутствовал. В большинстве случаев каталаза локализована в пероксисомах, как, например, в печени и почках или в микропероксисомах [152, 195, 431]. Однако имеются данные о ее наличии и в митохондриях [52–54, 152, 159, 277].

Каталаза содержится в клетке в высоких концентрациях ($10^{-6}M$) и обеспечивает расщепление перекиси водорода. Химические свойства каталазы описаны в ряде работ [135, 138, 152, 160, 423, 424]. Это — железосодержащий протопорфирин, обладающий двойной функцией: каталазной и пероксидазной, что принципиально отличает его от всех других ферментов. Бифункциональная активность каталазы связана с образованием ее промежуточного продукта — каталаза- H_2O_2 , или комплекс I [160]:



где $k_1 = 1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; $k_1' = 2,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; $k_4 = (0,2 - 1,0) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Эти уравнения описывают кинетику каталазы, выполняющую каталазную (32), (33) и пероксидазную (33), (34) функции. Интермедиат комплекс I не имеет формальной химической структуры, хотя он является несомненным продуктом окисления. Его образование может быть зарегистрировано в клетках и тканях оптическими методами. Оно включает перенос двух электронов от железа к перекиси, благодаря чему последняя восстанавливается и может длительное время не диссоциировать.

В двух последующих реакциях комплекс I выступает в роли либо окислителя (реакция 34), либо восстановителя (реакция 33). Обе эти реакции имеют совершенно различную кинетику. Каталазная реакция не подчиняется зависимости Михаэлиса—Ментена [160]. Активность фермента в этом случае возрастает при увеличении концентрации H_2O_2 в широких пределах значений их обоих. Каталазная активность преобладает при высоких концентрациях перекиси водорода в клетке, т. е. когда $k_1(\text{H}_2\text{O}_2) \gg k_4$ (донора). Иные отношения показаны для пероксидазной активности каталазы. В этом случае реакция подчиняется кинетике Михаэлиса—Ментена и характерная концентрация донора прямо пропорциональна числу оборотов каталазы [160]. Этот путь преобладает при низких концентрациях H_2O_2 в клетке.

Из этого следует, что количественное соотношение каталазы и перекиси в клетке обуславливает возможность для реализации либо пероксидазной, либо каталазной ее функции. Этот же принцип определяет различия между тканями: в эритроцитах, например, преобладает пероксидазная функция каталазы, в то время как в печени — каталазная. Колебания концентрации каталазы в различных органах и тканях при физиологических и патологических состояниях определяют неоднозначность стационарной концентрации H_2O_2 при одной и той же скорости ее генерации. Например, в печени и почках концентрация H_2O_2 низкая при высоком содержании каталазы. В сердце и мозге она значительно выше за счет низкого содержания каталазы [441, 539]. Азид и цианид подавляют ее каталитическую функцию и увеличивают концентрацию H_2O_2 , что, в свою очередь, активирует оборот оставшейся каталазы и тем самым постепенно уменьшает фракцию перекиси водорода в клетке.

Специфическим субстратом окисления для каталазы, выполняющей каталазную функцию, является H_2O_2 . При этом генерируется небольшое количество $^1\text{O}_2$ (0,5% от общего количества) [461]. Специфичность каталазы, выполняющей пероксидазную функцию, также достаточно велика: ее субстратами являются H_2O_2 , метил- и этилгидроперекиси. Донорами водорода для нее могут также быть алифатические спирты. Высокоактивны метиловый и этиловый спирт, малоактивны бутиловый и другие высшие гомологи спиртов.

Анаэробные бактерии имеют очень низкую активность каталазы, в то время как у аэробов она уже достаточно велика [125, 392]. Способность аэробных микроорганизмов поддерживать свою жизнедеятельность в атмосфере воздуха или в H_2O_2 обусловлена активностью каталазы.

Существуют патологии, связанные с недостаточностью каталазы в клетках. Так, нарушение ее уровня в эритроцитах известно под названием акаталаземии. Этот генетический дефект ведет к снижению активности каталазы в эритроцитах до 1% от нормы [530]. В таких эритроцитах в условиях кислородного стресса (повышения $p\text{O}_2$) происходит увеличение образования метгемоглобина [80], что подтверждает роль каталазы в удалении H_2O_2 . Такая аномалия встречается только в эритроцитах и компенсируется повышенным синтезом каталазы в печени [81].

Вторым ферментом, контролирующим уровень H_2O_2 в клетке, является глутатионпероксидаза (ГПД), локализованная в цитозоле (70%) и в матриксе митохондрий (30%) [231, 255]. В пероксисомах она отсутствует. ГПД способствует разложению перекиси водорода (и других гидроперекисей) в реакции окисления—восстановления глутатиона:



ГПД специфична для своего донора — GSH и неспецифична для гидроперекисей, в том числе органических (например, гидроперекисей жирных кислот различной структуры). Структура и кинетика ГПД достаточно хорошо описаны [231]. Последняя формально сходна с гемсодержащими пероксидазами. Максимальная скорость реакции при данной концентрации GSH не зависит от природы гидроперекиси, что подтверждено экспериментально для

H_2O_2 , этил-, *t*-бутил- и куменпероксидов [160]. k_1 восстановления ГПД перекисью водорода равно приблизительно $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, т. е. сходна с тем, что показано для каталазы.

ГПД имеет две активные формы: селензависимую и селеннезависимую, — распределение которых неодинаково в различных тканях [123, 231, 354, 441, 508]. Селензависимая ГПД утилизирует в качестве субстратов H_2O_2 и органические гидроперекиси, в то время как для селеннезависимой ГПД более специфичны органические гидроперекиси, и в присутствии H_2O_2 ее активность падает [123, 354].

Уровень ГПД в тканях подвержен сильным колебаниям и зависит от питания животных, условий их содержания, пола, сезона и пр. Наиболее высокая активность этого фермента характерна для печени и эритроцитов, где он и был впервые обнаружен. В мышце его активность низка [400, 402].

Известен генетический дефект, обуславливающий недостаточность ГПД в эритроцитах, когда она уменьшается в них до 25% от контроля [420]. Как и в случае акалатоземии, выраженных патологических симптомов при этом не наблюдается, однако увеличивается тенденция к гемолизу эритроцитов в присутствии окисляющих агентов [420].

Активация каталазы или ГПД зависит как от локализации обоих ферментов в клетке, так и от содержания в ней H_2O_2 . Ранее существовала точка зрения, что каталаза может вступать в действие лишь при очень высоких концентрациях H_2O_2 в клетке, а в физиологических условиях функцию ее разложения выполняет ГПД [327], т. е. практически ставился вопрос: какой фермент является ведущим в регуляции внутриклеточного уровня H_2O_2 ? Однако после работ Опино и Чанса [442, 445] стало ясно, что оба фермента ответственны за процесс, контролирующий поддержание стационарной концентрации H_2O_2 на различных субклеточных уровнях и в разных типах клеток. Каталаза особо эффективна при наличии больших количеств H_2O_2 , генерируемой в пероксисомах. ГПД способна не только утилизировать гидроперекиси, но и метаболизировать H_2O_2 в цитозоле и митохондриях. В метаболизме H_2O_2 ни один энзиматический путь не исключает другой [160].

В обычных физиологических условиях эндогенная перекись водорода образуется главным образом в пероксисомах, где 90% ее разлагается каталазой. Однако небольшая ее часть может, видимо, диффундировать в цитозоль и ме-

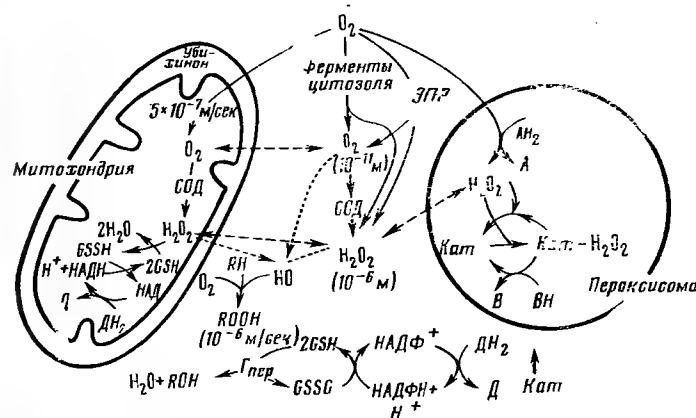


Рис. 38. Взаимодействие метаболических систем, генерирующих H_2O_2 в клетке [160]

таболизироваться в системе ГПД [114, 442]. То же самое наблюдается в присутствии экзогенно введенного гликолата — субстрата гликолатоксидазной реакции в пероксисомах. Основная часть H_2O_2 и в этом случае взаимодействует с каталазой. Однако активность ГПД также усиливается. Преимущественная активация каталазы происходит и при окислении гипоксантина H_2O_2 -генерирующим ферментом цитозоля ксантиноксидазой [442]. Но при введении экзогенной перекиси водорода ее метаболизм лишь на 40–60% связан с каталазой. Остальная часть приходится на ГПД [442].

Совершенно иное наблюдается при окислении субстрата моноаминоксидазы бензиламина. Разложение генерируемой в этой реакции H_2O_2 селективно связано с ГПД. Таким образом, каталаза и ГПД являются кооперативной внутриклеточной системой. Преимущественная компартментализация каталазы в пероксисомах, а глутатионпероксидазы в цитозоле и митохондриях облегчает их эффективное сотрудничество в метаболизме H_2O_2 [160] (рис. 38) и обеспечивает поддержание ее концентрации в клетке на уровне 10^{-9} – 10^{-7} M [441].

В отличие от каталазы и ГПД, участвующих в катаболизме H_2O_2 , клетка обладает ферментом, способствующим ее синтезу. Речь идет о широко распространенной в природе и представленной в различных тканях супероксиддис-

мутаза [238, 239]. Благодаря нее происходят непрерывная дисмутация O_2^- и его удаление (реакция 30). Этот же фермент является перехватчиком («скэвенджером») синглетного радикала [239]. Однако при физиологических условиях функция супероксиддисмутазы заключается не столько в каталитическом взаимодействии с 1O_2 , сколько в своевременном связывании супероксидного аниона и превращении его в менее токсичную перекись водорода [450]. Поэтому активность фермента проявляется, как правило, в том субклеточном компартменте, где имеет место генерация O_2^- . Основная активность супероксиддисмутазы связывается прежде всего с цитозолем [451, 457, 557, 579, 580] и в меньшей степени с митохондриями. В последних она обнаружена главным образом в матриксе — до 50% [111, 124], а также во внешней и внутренней мембране [160]. В пероксисомах этот фермент не найден.

Известна цинк- и медьсодержащая форма супероксиддисмутазы [239]. Она найдена в эритроцитах и матриксе митохондрий и отличается высокой чувствительностью к цианиду. В матриксе же митохондрий обнаружена цианид-нечувствительная марганецсодержащая ее форма. Наконец, известна железосодержащая форма супероксиддисмутазы, обладающая очень высокой чувствительностью к азиду [407].

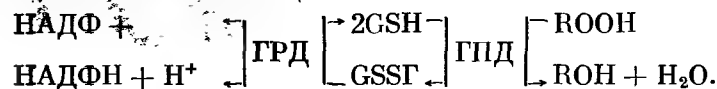
Наличие этих трех ферментов: каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы — обеспечивает поддержание стационарной концентрации перекиси водорода и свободных радикалов кислорода. На рис. 38 была показана их кооперативная работа в различных субклеточных компартментах. Рациональная регуляция, осуществляющая контроль за потоком H_2O_2 и образованием токсических продуктов, наглядно демонстрируется на примере митохондрий [429]. Супероксидные анионы, появляющиеся в результате транспорта электронов в дыхательной цепи, используются мембраносвязанной СОД в реакции дисмутации. Вывожение H_2O_2 из митохондриальной мембраны направлено векториально [428]: 80% ее диффундирует в матриксе митохондрий и только 20% в — цитозоль. Наиболее важный путь метаболизма H_2O_2 связан с матриксом митохондрий. До 57% ее разлагается здесь каталазой и лишь 15% связано с ГПД. Некоторое ее количество идет на образование $^{\bullet}OH$ (3%). Митохондриальная мембрана плохо проницаема для перекиси водорода. Кроме того, константа проницаемости внутренней мембраны митохондрий при ее диф-

фузии из матрикса в цитозоль равна 105 нмоль H_2O_2 /мин [429], а в обратную сторону — на порядок меньше. В связи с этим лишь очень небольшая ее часть (не более 5%) может диффундировать из матрикса в цитозоль и еще меньшая — из цитозоля в матрикс.

В отличие от этого другие биологические мембраны хорошо проницаемы для H_2O_2 . Константа проницаемости для пероксисомальных мембран составляет 0,2 см/мин [195] и 0,04 см/мин для мембран эритроцитов [423]. Эти величины сравнимы с проницаемостью мембран различных клеток для воды (0,02—0,42 см/мин) [197]. Проницаемость мембран эритроцитов для H_2O_2 выше, чем для большинства неэлектролитов; она примерно такая же, как для метанола, и ниже, чем для кислорода [228, 423]. Благодаря этому создается возможность диффузии перекиси водорода в пероксисомы из цитозоля и наоборот, а также ее поступления в межклеточную жидкость и далее в кровь, где она разрушается каталазой крови. Возможность такой диффузии предусматривает создание защитных механизмов других органов, имеющих низкое содержание каталазы (мозг, легкие, сердце) [425, 431, 539] или недостаточное количество глутатионпероксидазы (мышцы) [402].

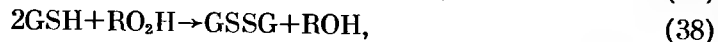
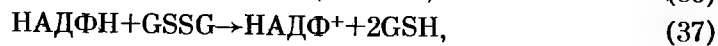
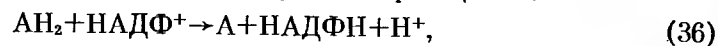
РЕГУЛЯЦИЯ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ КЛЕТКИ ПРИ МЕТАБОЛИЗМЕ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ

Ведущую роль в поддержании стационарного внутриклеточного редокс-состояния при метаболизме перекиси водорода играет глутатион. Он представляет собой основной клеточный фонд мобильных сульфгидрильных групп и содержится практически во всех тканях, а в клетках печени — в очень большом количестве (5 мк моль/г печени), главным образом в виде восстановленной формы (GSH). Окисленный глутатион GSSG клетки составляет всего 1—3% от общего его количества. Стационарное состояние редокс-пары окисленный—восстановленный глутатион (2 GSH/GSSG) обеспечивается системой ферментов глутатионпероксидазы (ГПД—ГПД) [159, 442].



Субстратами ГПД являются органические гидроперекиси и H_2O_2 . Субстратом ГРД является НАДФН, обра-

зующийся в различных метаболических путях клетки, но главным образом в пентозо-фосфатном цикле. Таким образом, процесс, катализируемый этими ферментами *in vivo*, может быть описан следующими реакциями:



где AH_2 и А — субстраты для НАДФН-генерирующей системы в восстановленной и окисленной форме; R — это H или алкильный остаток, соответствующий гидроперекиси или спиртам.

Зависимость интенсивности глутатионпероксидазной реакции от концентрации перекиси подчиняется нулевому порядку [231]. Поэтому в присутствии гидроперекиси наблюдается практически максимальное усиление этой реакции и оксидация GSH и НАДФН. Поддержание скорости реакции при этом может происходить лишь в условиях непрерывной регенерации GSSG с помощью НАДФН-зависимой ГРД. Следовательно, должен существовать постоянный приток в реакцию восстановительных эквивалентов в виде НАДФН, который является лимитирующим звеном восстановления гидроперекисей, и процесс в целом зависит от его генерации в различных метаболических путях. Для эритроцитов практически единственным путем получения НАДФН является ГМФШ [402]. Для других клеток этот цикл тоже имеет существенное значение. Его активация показана при окислительном стрессе в клетках печени [511], асцитных опухолевых клетках [96], в лейкоцитах [471], легких [456]. Дополнительным источником НАДФН во всех этих и других клетках могут быть изоцитрат-, малатдегидрогеназная и трансгидрогеназная реакции [429].

Возможность получения восстановительных эквивалентов для ГРД из иных источников, нежели ГМФШ, подтверждена на голодных животных, у которых его активность снижена. Однако выход GSSG из клетки, являющийся показателем эффективности окисления глутатиона, был примерно таким же, как у сытых животных, у которых активность шунта высокая [442]. Зависимость окисления гидроперекисей от внутриклеточного НАДФН может быть зарегистрирована спектрофотометрически [504, 506, 507]. При высоких концентрациях гидроперекиси НАДФН оки-

сляется очень сильно и его содержание падает до минимальных значений в интактной клетке. Если его регенерация не успевает произойти для поддержания ГПД-зависимой реакции, может начаться инициация перекисного окисления липидов [511]. В этих же условиях может произойти резкое нарушение энергетического потенциала клетки [160].

Существуют четкая внутриклеточная компартментализация ГПД и разделение функций между митохондриальным и цитозольным его пулами. В случае невысоких концентраций экзогенно вводимых субстратов ГПД изменения ее активности и редокс-изменения НАДФН/НАДФ⁺ регистрируются только в цитозоле. Однако при увеличении концентрации перекисей наблюдаются окисление митохондриального НАДН и активация ГПД митохондрий [160, 442]. Вместе с этим возможно поддержание реакций ГПД за счет энергозависимого пула НАДН митохондрий и субстратов, снабжающих восстановительными эквивалентами этот пул, например сукцината [442]. Наряду с приведенными в предыдущем разделе примерами взаимодействия и кооперации каталазы и ГПД цитозоля, эти данные свидетельствуют в пользу сложных регуляторных отношений между ферментными системами различных компартментов, участвующих в поддержании редокс-потенциала клетки в условиях метаболизма гидроперекисей. Эти отношения осложняются еще более на уровне взаимодействия различных метаболических путей. Восстановление глутатиона может зависеть от других НАДФН-зависимых процессов (например, липогенеза, уrogenеза, глюконеогенеза), активности монооксигеназных реакций. Наконец, функции различных сложных биологических процессов также могут зависеть от редокс-состояния клетки (клеточное деление, синтез белка, высвобождение гормонов и нейротрансмиттеров и пр.).

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

Как уже указывалось, перекись водорода, супероксидный анион и некоторые другие активные радикалы кислорода являются нормальными метаболитами в аэробных клетках. Несмотря на систему ферментов, снижающих их

внутриклеточную концентрацию, они всегда присутствуют в некотором количестве в обычных условиях. Более того, количество образующейся, например, перекиси водорода *in situ* в печени даже несколько больше, чем в изолированной перфузируемой печени или изолированных органеллах. В первом случае она составляет 380 нмоль/мин-мг ткани [445], что в 2 раза выше скорости ее образования изолированными субклеточными фракциями при 22° С и при полном снабжении субстратами (160 нмоль/мин-мг ткани) [114]. В перфузируемой печени скорость продукции H_2O_2 также меньше, чем *in situ* — 50–80 нмоль/мин-мг ткани (возможно, из-за неадекватности снабжения субстратами и недостатка гормональной стимуляции) [113, 114]. Однако эта скорость может быть увеличена в 15 раз в присутствии мочевины, тогда она достигает 750 нмоль/мин-мг ткани при 30° С. В этих условиях до 50% кислорода, утилизируемого органом, используется печенью для конвергирования в H_2O_2 [443–445]. Образование перекиси водорода в организме интактного животного такое же, как и *in situ* [285, 463]. До 75% от общего ее количества продуцируется в печени [445], и это соответствует потреблению 10–15% кислорода от общего его количества, утилизируемого организмом. Таким образом, реакции, генерирующие H_2O_2 в организме, являются мощными потребителями кислорода. Стационарная концентрация H_2O_2 в клетке составляет 10^{-9} – 10^{-7} М.

Из всего этого напрашивается предположение, что физиологические концентрации перекиси водорода не только не токсичны для клетки, но, видимо, необходимы для поддержания ее специфической функции. Действительно, H_2O_2 не индуцирует перекисное окисление [616] и высокоамплитудное набухание митохондрий [420], не нарушает дыхательный контроль в изолированных мембранах [85]. Существуют данные об ее участии в регулировании активности дыхательной цепи [52, 57, 109, 111, 112, 374, 425].

Известны примеры, когда использование H_2O_2 с терапевтическими целями оказывалось эффективным при различных патологиях, хотя молекулярный механизм наблюдаемых явлений пока не понят. Так, в практической медицине применяется введение слабых растворов H_2O_2 (0,2%) в аорту для ускорения восстановления после ишемии. Положительное действие этого приема не связано с образованием кислорода из перекиси в кровяном русле; предполагается прямое взаимодействие H_2O_2 с тканью

сердца [443]. Вполне возможно, что описанный эффект аналогичен известному действию H_2O_2 на адипоциты, в результате которого увеличивается транспорт глюкозы через плазматическую мембрану и уменьшается внутриклеточная концентрация циклической АМФ [535].

Пероксидазная функция каталазы может быть использована клеткой для самых различных синтезов, например тироидных гормонов [486] и, возможно, простагландинов [264, 461, 486, 568, 608].

Образование перекиси водорода в НАДФН-оксигеназной реакции играет особую роль при этанольной интоксикации, связанной с увеличением образования НАДН в цитозоле печени [541] и развитием дисбаланса в окислительно-восстановительном потенциале клетки [160].

Токсический эффект H_2O_2 проявляется, видимо, при концентрациях, значительно превышающих физиологические. Действительно, известно, что высокие ее концентрации могут инактивировать в течение 10 мин трансформацию ДНК [273], индуцировать в асцитных опухолевых клетках хромосомные aberrации после 16–36-часовой инкубации [499]. Введение глюкозооксидазы в кровь и последующая генерация H_2O_2 могут сопровождаться летальным исходом из-за непрерывной конверсии гемоглобина в метгемоглобин [224]. Атака гемоглобина или его субъединиц перекисью водорода может быть причиной их денатурации в интактных эритроцитах [55].

То же самое касается и супероксидного аниона. Известно, что он гораздо более реактивен, чем H_2O_2 . Он может инактивировать протеины (рибонуклеазу), липопротеины (лизин+РНК-лигазу) и рибонуклеопротеины (бактериофаг R-17) [353, 397]. Известно, что он является киллером для бактерий [353] и миобластов [397, 398]. O_2^- может вызывать структурные нарушения липидных мембран [557]. Однако и в этом случае речь идет о значительно более высоких его концентрациях, чем в условиях физиологической нормы. Будучи более токсичен, чем H_2O_2 , он образуется в клетке в количествах, на три порядка меньших 10^{-12} – 10^{-11} М [441]. Образование промежуточных активных радикалов кислорода, как известно, имеет принципиальное значение для оксигеназных реакций смешанной функции в мембранах эндоплазматического ретикулаума [222, 223, 585].

Супероксидный анион необходим для внедрения в молекулу субстрата во время каталитического цикла цито-

хрома Р-450 [222, 223]. Он включается в стадию инициации перекисного окисления липидов [525a]. Известно, что тканям интактных животных присущ низкий, но вполне определенный стационарный уровень липоперекисления, необходимый для участия в регулировании самых разнообразных функций организма: сокращении мышц, распространении возбуждения и поддержании лабильности возбудимых образований, формировании метаболического состояния дыхательной цепи, активном транспорте ионов, изменении проницаемости мембран. Липоперекиси являются необходимыми промежуточными продуктами при биосинтезе гормонов, простагландина Е₁ и прогестерона, участвуют в гидроксигировании стерольного ядра холестерина и пр. [31a].

Следовательно, вопрос о токсичности промежуточных метаболитов восстановления кислорода касается, видимо, лишь состояний, выходящих за пределы физиологической нормы, либо даже относящихся к разряду патологий. Одним из таких состояний является содержание организма в гипербарических условиях. Организмы, адаптированные к жизни в атмосфере воздуха, как уже указывалось, вырабатывали естественные защитные механизмы против токсического влияния кислорода, опасность влияния которого сохраняется либо в случае патологического нарушения этих механизмов, либо при увеличении рО₂ в окружающей среде по сравнению с нормальной для данного индивидуума, органов, тканей. В последнем случае, действительно, показано увеличение генерации Н₂О₂ [112, 113] и свободных радикалов в клетках и тканях [109, 142, 247], а также содержания и активности СОД в них после пребывания животных в гипербарических условиях [160, 444, 445]. При этом почти линейная зависимость образования О₂⁻ от концентрации рО₂ в митохондриях протекает на фоне генерации Н₂О₂ в митохондриях и пероксисомах [109, 113]. Однако в микросомах ее количество практически не меняется при гипербарических условиях [113]. Чистый кислород и кислород при повышенном давлении увеличивают генерацию Н₂О₂ в изолированных клетках печени от 60 до 200% [142]. В перфузируемой печени эффект значительно меньше, хотя при этом повышается потенциальная возможность образовывать перекись водорода, которая может проявиться в присутствии адекватных субстратов, например гликолата [160, 442-445, 508].

Появление избыточных свободных радикалов при рО₂ более 2 атм создает условия для уменьшения отношения НАДФН/НАДФ⁺ в клетке, высвобождения GSSG и активации перекисного окисления липидов, которое влечет за собой ряд вторичных изменений, выводящих из строя основные функциональные показатели жизнедеятельности организма, клетки. Подобная цепь событий описана для эритроцитов и мозга. В последнем случае инициация перекисного окисления липидов сопровождается в первые же 7 мин модификацией ЭЭГ, причем эти изменения опережают оксидативные изменения НАДФН, а через 15 мин регистрируется судорожная активность. Вторичные изменения связаны с увеличением проницаемости нейрональных мембран для К⁺, согласующимся с изменениями ЭКГ и являющимся причиной судорожного припадка с генерализованной спайковой активностью мозга [160].

Видимо, любые внешние воздействия, приводящие к увеличению промежуточных продуктов восстановления кислорода, будут способствовать нарушению деятельности ферментных систем, контролирующих протекание окислительных свободнорадикальных реакций, их дисбалансу, что будет приводить к резкому накоплению токсических продуктов и создавать условия для проявления связанных с ними эффектов. К таким воздействиям относятся лучевые поражения, действие ультрафиолетового излучения, старение клетки, воспалительные процессы, злокачественный рост, отравление токсическими хлоралканами и пр. Во всех этих случаях будут проявляться не только токсический эффект каждого метаболита индивидуально, но и последствия активации свободнорадикальных цепных процессов, приводящих к усилению перекисного окисления липидов, протекающих на фоне снижения антиоксидантной активности липидов и локализованных либо в фосфолипидах клеточных мембран, либо в белках опухолей, либо в мембранах лизосом.

Однако существуют клетки, которые сумели использовать повышенную генерацию перекиси водорода и свободных радикалов кислорода и их способность диффундировать в окружающую среду в качестве механизма естественной биологической защиты. В организме млекопитающих эту функцию сохранили в первую очередь фагоцитирующие клетки. У полиморфно-ядерных лейкоцитов (нейтрофилов) этот процесс сопровождается специфической «дыхательной вспышкой», включающей (согласно

современным представлениям) несколько последовательных этапов: 1) потребление кислорода и генерация O_2^- , а затем H_2O_2 (реакции 29, 30); 2) образование OH (реакция 27); 3) активация ГМФШ; 4) хемилюминесценция [525а]. Инициация процесса связана с активацией оксидазы, катализирующей реакцию между восстановленным пиридиннуклеотидом и молекулярным кислородом, в результате чего образуется окисленная форма нуклеотида и перекись водорода (I этап).

До сих пор дискутируется вопрос о том, какой субстрат используется в реакции: НАДФН или НАДН [86, 87, 91, 301]. Вполне возможно, что могут быть использованы оба субстрата, но сродство реакции к НАДФН больше [194]. Генерация O_2^- , например, в присутствии НАДФН в 6 раз больше, чем НАДН. До сих пор не решен вопрос о локализации НАД(Ф)Н-оксидазы в клетках. Она найдена как в цитозоле, так и в гранулярной фракции [91]. Последняя также может продуцировать O_2^- [319, 320].

Реакция сопровождается не только увеличением потребления кислорода, но и активацией ГМФШ [430, 490] и является нечувствительной к цианиду [490]. В результате происходит выделение клетками кислых продуктов в окружающую среду и восстановление нитросинего тетразолия [322], а также появление H_2O_2 [87, 300, 301, 480] и других активных радикалов кислорода, таких, как O_2^- [88, 532, 567], OH [334] и 1O_2 [82, 301]. В последнем случае реакция сопровождается хемилюминесцентной вспышкой [82, 301]. Антибактериальные свойства клеток связаны как с образованием H_2O_2 [450], так и с выделением активных радикалов (см. рис. 38) [450].

Насколько необходимо образование промежуточных продуктов восстановления кислорода для жизнедеятельности организма, видно из того факта, что у людей с дисфункцией генерации H_2O_2 лейкоцитами развивается заболевание, называемое грануломатозом. Установлено, что у таких больных нарушена трансформация НАДФН-оксидазы из неактивной формы в активную [194]. У нормальных людей нефагоцитирующие лейкоциты характеризуются аллостерической регуляцией окисления субстратов оксидазы (НАДН и НАДФН), т. е. ее активность проявляется лишь при концентрации НАДФН более 0,3 мМ. Однако при фагоцитозе появляется гиперболическая зависимость активности фермента и окисление НАДФН происходит при очень низких, физиологических концентрациях послед-

него (менее 0,05 мМ). В случае грануломатоза эта способность к переходу от аллостерической к гиперболической кинетике окисления отсутствует. «Дыхательная вспышка» и сопутствующие ей реакции образования продуктов антимикробного действия не развиваются, нейтрофилы оказываются неспособными убивать микроорганизмы, и тем самым создаются благоприятные условия для развития инфекций, что может привести к летальному исходу.

Второй пример энзимопатии — отсутствие ключевого фермента пентозо-фосфатного шунта — глюкозо-6-дегидрогеназы. В этом случае также не реализуются метаболические превращения, связанные с образованием токсических продуктов O_2 , но уже по другой причине: из-за отсутствия восстановленного НАДФ $^+$, необходимого для поддержания окислительно-восстановительных реакций цикла глутатиона.

Помимо нейтрофилов, свойство формировать «дыхательную вспышку» имеют и другие фагоцитирующие клетки: альвеолярные и перитонеальные макрофаги [244, 419, 614] (рис. 39, 40), макрофаги печени (купферовские или непаренхиматозные клетки) [562, 606], эозинофилы [193]. Последние являются слабофагоцитирующими клетками. Более того, в этот же список попадают и такие нефагоцитирующие клетки, как эритроциты [424] и яйца морского ежа [231—233, 298, 333]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что перекисеобразующая функция имеет более универсальное значение, нежели только антимикробное действие, и может быть связана с другими специализированными функциями «свободноживущих» клеток, например с необходимостью лизиса клеточной оболочки в период оплодотворения (яйца морского ежа).

Аналогия между процессом образования H_2O_2 в лейкоцитах и в яйцах морского ежа действительно очень большая. Образование H_2O_2 в период оплодотворения яиц морского ежа происходит на фоне «дыхательной вспышки», т. е. сопутствующего увеличения потребления кислорода [231—233, 333], сопровождается появлением синглетного кислорода [232] и хемилюминесценцией [298], а также активацией ГМФШ [298] и увеличением выделения секрета из клеток. Образующая в этом случае H_2O_2 является субстратом пероксидазы (овопероксидазы), которая высвобождается во время экзоцитоза из поверхностных гранул и каталитически разрушает твердую гликопротеидную оболочку яйца.

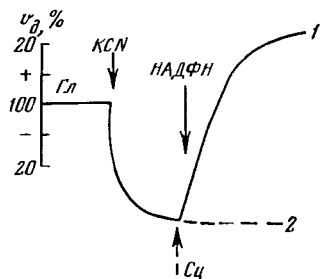
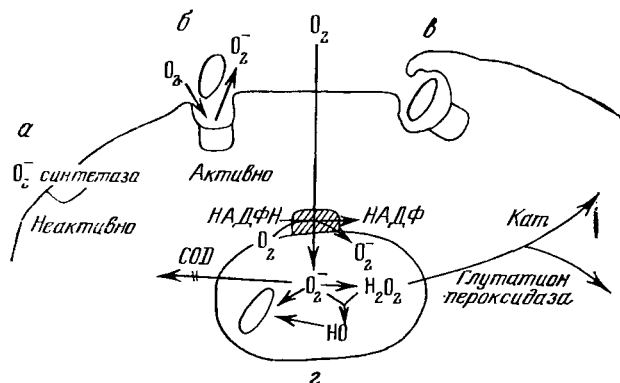


Рис. 39. НАДФН-оксиданная реакция в перитонеальных макрофагах, инициирующая «кислородную вспышку»
1 — цианиднечувствительная стимуляция дыхания в присутствии экзогенного НАДФН (1 мМ);
2 — сукцинат после KCN не влияет на дыхание

Рис. 40. Механизм «кислородной вспышки» в лейкоцитах [170]
а—з — последовательность протекания реакции



Таким образом, разные типы «свободноживущих» клеток не только закрепили в процессе эволюции способность образовывать токсические продукты промежуточного обмена кислорода, но и включили их в свою жизнедеятельность. Более того, сформировалась, по-видимому, сложная внутриклеточная рецепция сигнала в эффекторных клетках, для которых H_2O_2 может рассматриваться как эффекторная молекула [418]. Клетки, генерирующие большое количество H_2O_2 , должны были выработать свою собственную защиту от ее токсического действия и свободных радикалов. То, что эти продукты могут нарушать фагоцитоз и хемотаксис, а также укорачивать продолжительность жизни клеток — известно. Организация этой защиты построена, видимо, по общему принципу, показанному для всех других тканей, т. е. связана с механизмом инактивации промежуточных продуктов восстановления кислорода через каталазу, СОД и ГПД [244, 485].

Однако в различных типах клеток эти системы инактивации H_2O_2 представлены неоднозначно. Каталаза и ГПД связаны, видимо, реципрокно. У крыс и мышей, например, нейтрофилы имеют мало каталазы. Увеличение активности ГМФС при генерации перекиси водорода связано у них с глутатионпероксидазой—глутатионредуктазой системой ее детоксикации. В то же время у человека и морской свинки разложение перекиси водорода в тех же клетках обеспечивается преимущественно каталазной системой цитоплазмы [278].

* * *

В клетке имеет место активное образование перекиси водорода, супероксидного аниона и некоторых других возбужденных состояний кислорода. Все они могут рассматриваться как необходимые метаболиты, участвующие в реализации различных физиологических функций и включающиеся в круг кислородзависимых процессов в клетке. Существует строгая компартментализация при генерации всех этих продуктов. Поддержание их стационарной концентрации необходимо для нормальной жизнедеятельности клетки и осуществляется с помощью взаимодействия ферментов: каталазы, ГПД и СОД. Регулирующая и контролирующая роль этой системы чрезвычайно важна. В патологических условиях дисбаланс в ней может привести к накоплению свободнорадикальных продуктов и проявлению их токсического эффекта, приводящего к гибели клетки. Однако гипергенерация промежуточных продуктов восстановления кислорода используется рядом фагоцитирующих клеток в качестве антибактериального средства.

5. ОБМЕН ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМИ ЭКВИВАЛЕНТАМИ МЕЖДУ КЛЕТКОЙ И СРЕДОЙ

Изложенные выше данные свидетельствуют о том, что в настоящее время значение показателей, характеризующих взаимодействие различных кислородзависимых процессов в клетке, является важной характеристикой ее функционального состояния.

Для того чтобы обеспечить возможность переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий и сопряженный с ним синтез АТФ, система НАД⁺/НАДН должна поддерживаться на определенном уровне восстановленности. Величина этого отношения, определяемая по концентрациям участников реакций, находящихся в равновесии с парой НАД⁺/НАДН, примерно равна 10. В случаях, когда происходит резкое увеличение этого отношения (до 1000), наблюдаются обращение окислительного фосфорилирования на уровне флавопротеида и цитохрома с и сопряженный с этим гидролиз АТФ. С другой стороны, поддержание необходимой скорости гликолиза в цитоплазме требует иного состояния пары НАД⁺/НАДН. Отношение НАД⁺/НАДН, подсчитанное по данным измерения концентраций лактата и пирувата в замороженных образцах печени, достигает нескольких сот (примерно 700 для печени сытых крыс и снижается до 528 и 208 для голодных животных и при аллоксановом диабете соответственно) [62].

Таким образом, одновременное протекание гликолиза в цитоплазме и синтез АТФ в митохондриях происходят в условиях большой разницы в величинах отношений НАД⁺/НАДН в цитоплазме и митохондриях. Это, в свою очередь, обуславливает непроницаемость митохондриальной мембраны для НАД⁺ и НАДН и соответственно наличие челночных механизмов обмена восстановительными эквивалентами между цитоплазмой и митохондриями, причем свойства этих челноков не должны допускать выравнивания окислительно-восстановительных потенциалов в цитоплазме и митохондриях. Челочный перенос восстановительных эквивалентов должен протекать достаточно быстро, с тем чтобы обеспечить эффективную смену энергетического режима клетки в ответ на изменения окружающих условий. Именно такой обмен лежит в основе механизма эффекта Пастера, регулирующего метаболизм глюкозы в зависимости от содержания кислорода в клетке.

Необходимость источника восстановительных эквивалентов для протекания в цитоплазме ряда восстановительных процессов, которые не могут использовать НАДН в силу низкого уровня восстановленности пары НАД⁺/НАДН в цитоплазме, обуславливает существование в ней еще одной окислительно-восстановительной системы — НАДФ⁺/НАДФН, которая также способна обмениваться восстановительными эквивалентами с митохондриями. В клетках печени отношение НАДФ⁺/НАДФН дости-

гает величины 0,01 [345], т. е. степень восстановленности НАДФН в 10⁵ раз больше, чем НАДН.

Поддержание высокого уровня восстановленности в цитозоле обеспечивается не только за счет работы ГМФШ, но и при участии митохондриальных восстановительных систем. Здесь, как и в предыдущем случае, свойства челочных механизмов обмена восстановительными эквивалентами не должны допускать выравнивания окислительно-восстановительных потенциалов различных систем, участвующих в обмене.

Таким образом, сравнение окислительно-восстановительных равновесий внутри различных окислительных систем клетки позволяет рассматривать обмен восстановительными эквивалентами как процесс, обеспечивающий реакцию клетки на изменения внешних условий или изменения энергопотребностей самой клетки.

Вопросам обмена восстановительными эквивалентами, происходящего между внутриклеточными окислительными процессами, уделяется, судя по приведенным данным литературы, рассмотренным в предыдущих главах, большое внимание.

В свою очередь совокупность окислительно-восстановительных превращений, осуществляемых клеткой, находится в условиях относительной изоляции по отношению к внеклеточной среде. В этой связи представляется актуальной постановка вопросов о существовании и физиологической роли обмена восстановительными эквивалентами между клеткой и средой, аналогично тому, как это представление было развито в отношении внутриклеточных систем.

Несмотря на отсутствие в доступной литературе систематического рассмотрения этой проблемы, развивая указанную аналогию, можно предположить, что наличие обмена с внеклеточными редокс-системами могло бы расширить для клетки возможность изменений внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в зависимости от изменений условий окружающей среды. Это предположение следует из того, что перенос электронов от внутриклеточных восстановителей на внешние редокс-системы можно рассматривать как путь, альтернативный восстановлению кислорода при участии внутриклеточных термивальных оксидаз.

Обмен восстановительными эквивалентами между клеткой и средой или между клетками ткани может приобре-

тать поэтому особое значение в условиях сниженного содержания кислорода, затрудняющих перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий на конечный акцептор — кислород.

Развитие этого направления в значительной мере зависит от наличия экспериментальных подходов к исследованию взаимодействия внутриклеточных восстановителей с окислительно-восстановительными системами окружающей среды. В настоящей главе приведены данные экспериментального исследования, целью которого являлось установить у клеток разного типа, во-первых, наличие обмена восстановительными эквивалентами с окружающей средой, во-вторых, наличие окислительной системы или систем, обеспечивающих восстановление внеклеточного окислителя, в-третьих, механизма обмена восстановительными эквивалентами между внутри- и внеклеточными системами, участвующими в формировании внеклеточного окислительно-восстановительного потенциала.

В соответствии с поставленной задачей была предложена модельная ситуация, в которой роль внеклеточной редокс-системы выполняет искусственный акцептор электронов — феррицианид калия. Выбор этого акцептора обусловлен в первую очередь тем, что он не способен проникать сквозь клеточные мембраны, а также тем, что он позволяет проводить количественную регистрацию процесса восстановления как оптическим, так и потенциометрическим методами.

В данной главе рассмотрены возможности использования скорости восстановления феррицианида калия для исследования обмена восстановительными эквивалентами между клеткой и средой на примере таких объектов, как эритроциты, дрожжи, клетки асцитной опухоли и срезы печени крысы.

ПЕРЕНОС ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ ЭРИТРОЦИТОВ

Энергетический метаболизм эритроцитов представлен гликолизмом и ГМФШ. У них отсутствует система митохондриального окисления, находящаяся обычно в сложных отношениях с другими системами окисления, лишенными терминальных оксидаз. Это упрощает экспериментальное решение вопроса об источнике восстановительных эквивалентов, переносимых на систему ферри-ферроцианида.

При потенциометрической регистрации окислительно-восстановительного потенциала суспензии эритроцитов человека в присутствии $K_3 [Fe(CN)_6]$ — искусственного акцептора электронов не проникающего сквозь клеточные мембраны [529], наблюдается типичная кривая потенциометрического титрования ионов феррицианида (рис. 41). Восстановителем в этом случае являются эритроциты. Это позволяет выбрать феррицианид в качестве медиатора, одновременно взаимодействующего с окислительно-восстановительными системами эритроцита и устанавливающего потенциал на платиновом электроде. Данные, приведенные в работе [5], позволяют установить источник восстановительных эквивалентов, переносимых через мембрану эритроцитов.

Из рис. 42 видно, что присутствие глюкозы существенно увеличивает скорость восстановления феррицианида. Поскольку для эритроцитов глюкоза является практически единственным субстратом окисления, ее влияние на измеряемую величину свидетельствует о связи восстановления феррицианида с метаболической активностью эритроцитов. Как указывалось выше, мембрана эритроцитов непроницаема ни для окисленной, ни для восстановленной форм. Феррицианид может без участия катализаторов восстанавливаться целым рядом биологических восстановителей, в том числе SH-глутатионом, НАДН и НАДФН, аскорбиновой кислотой. Поэтому наблюдаемое восстановление этого акцептора эритроцитами может происходить при участии в этом процессе какой-либо присущей эритроцитам окислительно-восстановительной системы, осуществляющей перенос восстановительных эквивалентов через мембрану по «челночному» механизму. Оррингер и Рэр [441] отводят роль такого челнока системе аскорбат—дегидроаскорбат, поскольку в нормальной крови постоянно присутствует 18—25 мкМ аскорбиновой кислоты. Известно, что дегидроаскорбат легко проникает в эритроцит, может там восстанавливаться при участии внутриклеточных восстановителей и аскорбатдегидрогеназы до аскорбата, который затем покидает клетку. Во внеклеточном пространстве аскорбат окисляется феррицианидом до дегидроаскорбата, и дальше цикл может продолжаться до исчерпания какого-либо из компонентов системы.

Из рис. 43 видно, что внесение 10^{-5} М аскорбиновой кислоты вызывает примерно двукратное увеличение скорости восстановления феррицианида. Аскорбат в концентрации

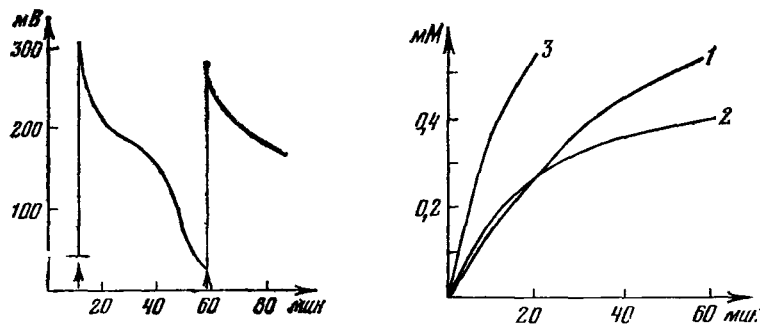


Рис. 41. Восстановление феррицианида калия в суспензии эритроцитов человека

По оси ординат — значения потенциала, измеряемые платиновым электродом, относительно хлорсеребряного. Стрелками отмечены моменты внесения феррицианида калия

Рис. 42. Влияние глюкозы и метиленового синего на образование ферроцианида

По оси ординат — концентрация ферроцианида калия, рассчитанная по измеренным значениям потенциала; 1 — отмывка эритроцитов и измерения в среде, содержащей 10^{-2} М глюкозы; 2 — то же в отсутствие глюкозы; 3 — 10^{-2} М глюкозы + $5 \cdot 10^{-6}$ М метиленового синего

$5 \cdot 10^{-5}$ М вызывает дополнительное увеличение скорости (см. рис. 43, III). Дальнейшее увеличение концентрации аскорбата не приводит к увеличению скорости процесса. Этот результат соответствует данным работы [441], в которой показано, что эффект дегидроаскорбиновой кислоты «насыщается» при концентрациях, больших $5 \cdot 10^{-5}$ М, и согласуется с гипотезой об участии аскорбиновой кисло-

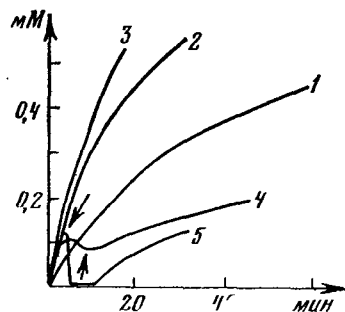


Рис. 43. Влияние аскорбиновой кислоты и трет-бутилгидроперокси на образование ферроцианида

1 — контроль;
2 — аскорбиновая кислота (10^{-5} М);
3 — аскорбиновая кислота ($5 \cdot 10^{-5}$ М);
4 — трет-бутилгидроперекись (10^{-3} М) + аскорбиновая кислота ($5 \cdot 10^{-5}$ М);
5 — трет-бутилгидроперекись (10^{-3} М) и метиленовый синий ($5 \cdot 10^{-6}$ М).
Стрелками отмечены моменты внесения трет-бутилгидроперекиси и аскорбиновой кислоты (или метиленового синего на графике 5). Все измерения проведены в присутствии 10^{-2} М глюкозы

ты в челночном механизме транспорта внутриклеточных восстановительных эквивалентов.

В настоящее время у большинства клеток млекопитающих установлено наличие редокс-системы, включающей НАДФН-зависимую глутатионредуктазу и обеспечивающей поддержание высокого уровня восстановленности SH-глутатиона. Для эритроцитов такое состояние пула глутатиона является необходимым условием сохранения их целостности, так как образующиеся в ходе перекисного окисления липидов органические перекиси разлагаются при участии глутатионзависимой пероксидазы. При этом высокое содержание глутатиона (около $3 \cdot 10^{-3}$ М) обеспечивает устойчивость этого процесса.

Восстановительные эквиваленты, переносимые из эритроцитов на феррицианид, могут поставляться восстановителями, связанными либо с системой ГМФШ, либо с гликолизом. Исходя из того, что равновесие окислительно-восстановительной системы $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$, связанной с гликолизом, гораздо менее смещено в сторону восстановления, чем равновесие системы глутатиона или $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$, естественно ожидать, что последние играют преимущественную роль в процессе восстановления феррицианида эритроцитами.

Для проверки этого предположения были использованы такие воздействия на систему ГМФШ эритроцитов, как внесение в среду искусственного акцептора электронов — метиленового синего и трет-бутилгидроперекиси. Относительно метиленового синего известно, что, окисляя НАДФН в эритроцитах, он способен в 5–8 раз увеличивать скорость утилизации глюкозы в ГМФШ [40, 92]. При этом состояние кофакторов гликолиза НАД и НАДН не меняется [201].

Восстановленная форма метиленового синего может окисляться, взаимодействуя с молекулярным кислородом, осуществляя тем самым «футильный» цикл. Лимитирующим фактором для ГМФШ эритроцитов является доступность окисленной формы кофактора (НАДФ^+) [62]. Метиленовый синий увеличивает концентрацию НАДФ^+ и снимает это ограничение. При этом возрастает скорость потребления глюкозы, утилизируемой эритроцитами в ГМФШ. С другой стороны, метиленовый синий может участвовать в челночном переносе внутриклеточных восстановительных эквивалентов на феррицианид, подобно тому как это рассматривалось для аскорбата. Если пре-

имущественным источником восстановительных эквивалентов является ГМФШ, то в присутствии метиленового синего должно произойти резкое увеличение скорости восстановления феррицианида. Действительно, результат опыта отвечает этому предположению, так как скорость восстановления феррицианида в присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ М метиленового синего в несколько раз больше контрольной и вдвое превосходит таковую в присутствии максимальной концентрации аскорбата (см. рис. 43, кривая III).

Другим свидетельством того, что именно ГМФШ, а не гликолиз обеспечивает восстановление феррицианида в суспензии эритроцитов, являются опыты, проведенные в присутствии бутилгидроперекиси. Относительно этого соединения известно, что оно очень быстро (за несколько секунд) может полностью окислять SH-глутатион в эритроцитах при внесении в эквимольных количествах [517]. Действие бутилпероксида избирательно по отношению к SH-глутатиону, так как в эритроцитах этот процесс катализируется глутатионзависимой пероксидазой. По этой причине внесение бутилпероксида должно приводить к избирательному окислению восстановителей, связанных с системой ГМФШ. В присутствии глюкозы спустя несколько минут уровень SH-глутатиона начинает восстанавливаться, достигая исходного значения спустя 25 мин [517]. Из рис. 43 видно, что, действительно, внесение бутилпероксида полностью прекращает процесс восстановления феррицианида в суспензии эритроцитов. Спустя несколько минут восстановление феррицианида возобновляется, т. е. в условиях полного окисления восстановителей, связанных с ГМФШ, процесс переноса внутриэритроцитарных восстановительных эквивалентов на феррицианид останавливается и возобновляется по истечении времени, необходимого на истощение добавленного количества бутилгидроперекиси. Аналогичные результаты получены в присутствии метиленового синего и аскорбата. Тот факт, что аскорбат или метиленовый синий не предотвращают эффекта бутилпероксида, также свидетельствует о том, что, участвуя в челночном переносе восстановительных эквивалентов, эти соединения взаимодействуют главным образом с системой ГМФШ.

Измерения SH-глутатиона при совместном внесении аскорбата и феррицианида показало, что уровень SH-глутатиона снижается на 20–30% сразу после внесения феррицианида и аскорбата и по мере истощения окисленной

формы системы ферри-—ферроцианида начинает возрастать, приближаясь к исходному уровню. Ни аскорбиновая кислота, ни феррицианид отдельно взятые не могут вызвать столь большого уменьшения содержания SH-глутатиона в эритроцитах.

Эти результаты свидетельствуют о том, что в отсутствие аскорбата «узким местом» процесса восстановления феррицианида калия в суспензии эритроцитов является трансмембранный перенос восстановительных эквивалентов. Одновременное присутствие аскорбата и феррицианида смещает «узкое место» процесса в область регенерации SH-глутатиона. Таким образом, совместное присутствие аскорбата и феррицианида позволяет сравнивать эритроциты разных доноров по максимальной активности системы ГМФШ, обеспечивающей поддержание уровня восстановленности SH-глутатиона в условиях «окислительной нагрузки». Для проверки этого положения были взяты эритроциты у доноров с дефицитом активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, обуславливающим снижение максимальной скорости ГМФШ. Действительно, у таких эритроцитов скорость восстановления феррицианида калия в присутствии аскорбиновой кислоты оказалась существенно ниже, чем у эритроцитов нормальных доноров. (Результат получен совместно с ЦОЛИПК АМН СССР).

Таким образом, обсуждаемые данные позволяют констатировать наличие окислительно-восстановительного взаимодействия между непроникающим акцептором электронов и эритроцитами. Основным источником восстановительных эквивалентов при этом является ГМФШ. Транспорт восстановительных эквивалентов через мембрану может осуществляться по челночному механизму при участии редокс-системы, способной восстанавливать внеклеточный акцептор электронов и окислять внутриклеточные восстановители, проникая в эритроцит. Использование аскорбиновой кислоты либо метиленового синего позволяет осуществлять последовательную смену «узких мест» в процессе переноса восстановительных эквивалентов на внеклеточный акцептор.

В принципе описанный подход может быть применен и к другим объектам с более сложным, чем у эритроцитов, энергетическим обменом с сохранением последовательности выяснения указанных вопросов.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФЕРРИЦИАНИДА КАЛИЯ В СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Роль обмена восстановительными эквивалентами между клеткой и средой наиболее очевидна при изучении условий жизнедеятельности микроорганизмов. Известно, что начальная стадия размножения бактерий связана со сдвигом окислительно-восстановительного потенциала в сторону отрицательных значений [65, 276]. Наиболее быстрое его изменение в среде совпадает с начальным периодом задержки роста, предшествующим логарифмической фазе роста. Сдвиг окислительно-восстановительного потенциала в сторону отрицательных величин при внесении искусственных акцепторов электронов почти полностью снимает начальную задержку роста бактерий. Наоборот, искусственное смещение окислительно-восстановительного потенциала в сторону положительных величин на много часов затягивает начальный период [65]. В процессе роста ряда бактериальных культур окислительно-восстановительный потенциал среды, смещаясь в сторону отрицательных величин, достигает предельного значения, при котором прекращается дальнейшее развитие культуры [276]. Электрохимическое смещение окислительно-восстановительного потенциала в обратном направлении стимулирует дальнейший рост культуры в этих условиях [323]. Анаэробные штаммы способны создать большие сдвиги окислительно-восстановительного потенциала по сравнению с аэробами. Однако анаэробы не способны влиять на среду с потенциалом, характерным для аэробных условий. Если окислительно-восстановительный потенциал среды искусственно сместить до критического для анаэробов значения, то далее они могут сами активно смещать потенциал в область отрицательных значений. Таким образом, метаболическая активность микроорганизмов в общем случае сопровождается изменениями окислительно-восстановительного потенциала среды обитания. При этом сам окислительно-восстановительный потенциал среды в значительной мере определяет возможность культуры для размножения. Проблема изучения природы такой обратной связи естественно приводит к постановке вопросов, касающихся обмена восстановительных эквивалентов между клетками микроорганизмов и средой инкубации. В этой связи нами были рассмотрены такие представители микроорганизмов, как клетки дрожжей *Saccaromyces cerevisiae*.

На рис. 44 представлена запись типичных изменений окислительно-восстановительного потенциала суспензии дрожжей при внесении $1 \cdot 10^{-4}$ М $K_2 [Fe(CN)_6]$, которое производилось после установления pO_2 в суспензии на уровне 3—5 мм рт. ст. Видно, что дрожжи восстанавливают феррицианид калия, подобно тому как это происходит в суспензии эритроцитов человека [5, 9], и цитрат натрия увеличивает активность этого процесса. (Контрольные измерения показали, что цитрат не способен восстанавливать феррицианид в отсутствие дрожжей, как это имеет место, например, для аскорбиновой кислоты.) Этот результат говорит о том, что, как и в случае эритроцитов, феррицианид калия может быть использован для количественной оценки способности микроорганизмов влиять на окислительно-восстановительный потенциал среды в условиях лаг-периода.

На рис. 45 представлена запись изменений окислительно-восстановительного потенциала суспензии дрожжей (кривая 1а) и надосадка, полученного после центрифугирования такой же суспензии. Видно, что надосадок суспензии дрожжей после 3-часовой инкубации обладает заметной восстановительной активностью по отношению к феррицианиду калия. Этот факт говорит о том, что перенос восстановительных эквивалентов в среду инкубации происходит и в отсутствие феррицианида. Очевидно, количество восстановительных эквивалентов, перенесенных в среду за время инкубации, может быть измерено путем последовательных добавок феррицианида в соответствующий надосадок вплоть до исчерпания его «буферной емкости». Такое измерение в принципе позволяет оценить работу, производимую клетками в течение лаг-периода для создания оптимальных окислительно-восстановительных условий в окружающей среде.

Кривая 3а (см. рис. 45) представляет результат измерения, проведенного на «свежеотмытой» суспензии, которая получается путем дополнительного центрифугирования с последующей заменой надосадка на свежую среду и ресуспендированием клеток. Видно, что восстановительная активность суспензии свежеотмытых клеток гораздо меньше, чем у исходной 3-часовой суспензии. Присутствие цитрата натрия во всех случаях увеличивает интенсивность восстановления феррицианида, при этом количественные соотношения между суспензией, надосадком и свежеотмытой суспензией сохраняются такими же, как и без цитрата

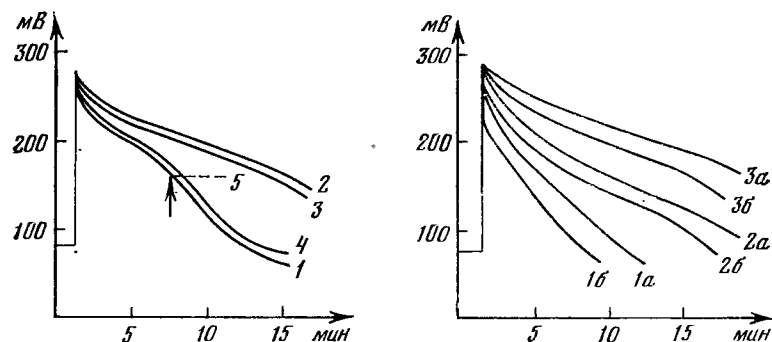


Рис. 44. Изменения окислительно-восстановительного потенциала суспензий дрожжей в присутствии 10^{-4} М $K_3[Fe(CN)_6]$

1 — $2 \cdot 10^{-2}$ М цитрата натрия; 2 — 10^{-2} М глюкозы; 3 — без добавок; 4 — $2 \cdot 10^{-2}$ М цитрата натрия, внесенного за 3 ч. до измерения; 5 — $5 \cdot 10^{-3}$ мМ диамида. Момент внесения диамида отмечен стрелкой. Остальные добавки делались непосредственно перед измерением (кроме опыта 4). Преслованные дрожжи разводились в дистиллированной воде (40 мг сухого веса на 10 мл H_2O). Измерения производились после 3-часового встряхивания (50–60 качаний/мин)

Рис. 45. Изменения окислительно-восстановительного потенциала суспензии дрожжей и среды инкубаций

1 — суспензия дрожжей; 2 — надсадок суспензии; 3 — свежееотмытая суспензия; а — без добавок; б — в присутствии $2 \cdot 10^{-2}$ М цитрата натрия

(см. рис. 45, 16–36). В свежееотмытой суспензии феррицианид восстанавливается за счет восстановительных эквивалентов, поступающих из клеток только за время самого измерения, поскольку соответствующий надсадок не способен восстанавливать феррицианид. В случае 3-часовой преинкубации суспензии источником восстановительных

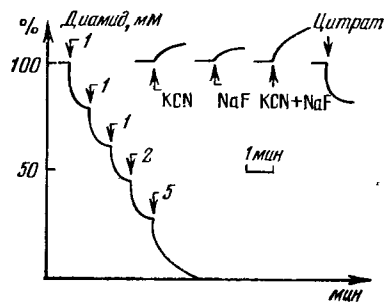


Рис. 46. Относительные изменения интенсивности флуоресценции суспензии дрожжей при внесении различных добавок

Измерения проводились на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ И-2; $\lambda_{возб}$ —360 нМ; $\lambda_{жал}$ —470 нМ

Таблица 20. Влияние некоторых ингибиторов окислительного метаболизма на время восстановления $K_3[Fe(CN)_6]$, (% от исходного)

Субстрат	KCN (1 мМ)	Амитал (1 мМ)	NaF (1 мМ)	NaF + + амитал	NaF+KCN
—	95±9	100±8	100±7	42±9	58±10
Цитрат Na (20 мМ)	94±8	98±7	96±7	59±8	42±7

эквивалентов являются как сами клетки, так и среда инкубации, содержащая восстановительные эквиваленты, поступившие в нее из клеток за весь предшествующий измерению период инкубации. Тот факт, что цитрат увеличивает измеряемую величину в обоих случаях, говорит о том, что восстановительная активность суспензии по отношению к феррицианиду калия тесно связана с метаболической активностью дрожжевых клеток. Это позволяет проводить сравнительную оценку различных воздействий на потенциалобразующую активность дрожжей как на свежееотмытых клетках, так и после предварительной инкубации, используя такую характеристику, как время, необходимое для восстановления одного и того же количества феррицианида калия.

В табл. 20 представлены результаты опытов по влиянию различных ингибиторов окислительного метаболизма на скорость восстановления $K_3[Fe(CN)_6]$ дрожжами в присутствии 20 мМ цитрата натрия и без него. За 100% принято время, необходимое для восстановления 10^{-4} М феррицианида в отсутствие ингибиторов.

Как видно из табл. 20 ингибиторы переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий не вызывают достоверных изменений скорости, восстановления феррицианида калия ни на НАД-зависимом участке (амитал), ни на уровне цитохромоксидазы (KCN). То же самое относится и к ингибитору гликолиза NaF. При совместном внесении амитала и NaF время восстановления уменьшается до 60%.

Полная остановка процесса восстановления феррицианида калия наблюдается при внесении диамида (см. рис. 44, 5). Эти данные находятся в согласии с результатами измерения флуоресценции пиридиновых нуклеотидов в суспензии дрожжей при внесении тех же ингибиторов. Из

рис. 46 видно, что последовательное увеличение концентрации диамида вызывает падение сигнала флуоресценции, подобно тому как это происходит в суспензии асцитных клеток [101]. KCN и NaF в отдельности не вызывают заметных изменений, но добавленные вместе увеличивают интенсивность флуоресценции.

Сопоставление данных табл. 20 и рис. 46 показывает, что изменения скорости восстановления феррицианида в суспензии дрожжей происходят параллельно с изменениями уровня восстановленности пиридиновых нуклеотидов. Эти результаты позволяют констатировать тесную связь между потенциалобразующей активностью клеток микроорганизмов и уровнем восстановленности внутриклеточных кофакторов окислительного обмена. Так, истощение внутриклеточных восстановителей диамидом снижает как восстановленность пиридиновых нуклеотидов, так и скорость восстановления феррицианида. Эффект одновременного присутствия KCN и NaF либо NaF и амиталя можно объяснить тем, что их совместное действие снижает возможности внутриклеточного обмена восстановительных эквивалентов и приводит к увеличению восстановленности пиридиновых нуклеотидов. При этом путь переноса восстановительных эквивалентов на внешние редокс-системы получает преимущество, что выражается в увеличении скорости восстановления феррицианида.

Эти результаты демонстрируют зависимость потенциалобразующей активности клеток дрожжей от взаимодействия кислородзависимых и кислороднезависимых систем окисления этих клеток. Таким образом, обсуждаемый материал находится в соответствии с представлением о взаимосвязи окислительно-восстановительного потенциала среды окружения и метаболической активностью микроорганизмов. Развитие этого подхода может позволить более детально исследовать взаимодействие различных окислительных систем клеток микроорганизмов и их относительный вклад в изменение окислительно-восстановительного потенциала окружающей среды в зависимости от функционального состояния клеток [9].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФЕРРИЦИАНИДА КАЛИЯ В СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Клетки асцитных опухолей представляют особый интерес для изучения обмена восстановительными эквивалентами с окружающей средой, поскольку, будучи представителями клеток млекопитающих с полноценной митохондриальной системой *in vivo*, они функционируют в гипоксических условиях. При изоляции и переводе в аэробные условия эти клетки обнаруживают все признаки, характеризующие окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи митохондрий аэробных клеток.

На рис. 47 представлены типичные кривые потенциометрической регистрации окислительно-восстановительного потенциала суспензии клеток асцитной карциномы Эрлиха мыши в присутствии феррицианида калия (10^{-4} М). Видно, что суспензия свежееотмытых клеток способна восстанавливать $K_3[Fe(CN)_6]$ (см. рис. 47, 1) в отличие от надосадка этой же суспензии клеток (см. рис. 47, 1'). Внесение дитиодипиридина (1 мМ) — соединения, легко проникающего в асцитные клетки и быстро окисляющего редокс-системы, связанные с SH-глутатионом [254], прекращает восстановление феррицианида (см. рис. 47, пунктирная линия). Эти данные свидетельствуют о том, что $K_3[Fe(CN)_6]$ восстанавливается при участии внутриклеточных окислительно-восстановительных систем. Внесение аскорбиновой кислоты (10 мкМ) заметно увеличивает скорость восстановления феррицианида (см. рис. 47, 3). Поскольку количество вносимого аскорбата на порядок ниже, чем количество феррицианида, наблюдаемый эффект не может быть объяснен прямой реакцией аскорбиновой кислоты с феррицианидом калия и скорее всего обеспечивается либо действием дегидроаскорбата на окислительно-восстановительное равновесие, либо влиянием его на транспорт восстановительных эквивалентов через клеточную мембрану.

В суспензии асцитных клеток, инкубируемых на шейкере в течение 1,5 ч, значительно повышается скорость восстановления феррицианида. Следует отметить, что надосадок такой суспензии клеток уже способен восстанавливать $K_3[Fe(CN)_6]$ практически с той же скоростью, что и сама суспензия, в отличие от приведенного выше эксперимента со свежееотмытыми клетками (см. рис. 47, 1 и 1'; 2 и 2'). Этот результат свидетельствует о том, что редокс-

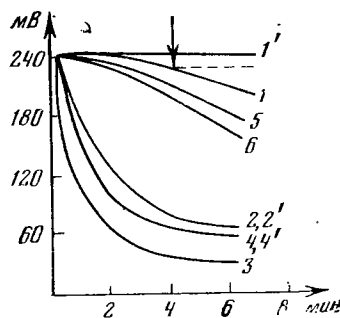


Рис. 47. Изменения окислительно-восстановительного потенциала суспензии асцитных клеток Эрлиха и среды инкубации

1 и 1' — суспензия и надосадок свежотмытых клеток соответственно; 2 и 2' — то же для клеток, инкубированных в течение 1,5 ч без дополнительной отмывки; 3 — суспензия асцитных клеток Эрлиха, инкубированных с аскорбиновой кислотой без дополнительной отмывки; 4 и 4' — суспензия и надосадок после инкубации с KCN без дополнительной отмывки; 5, 6 — суспензия кле-

ток, инкубированных с KCN и аскорбатом соответственно. Измерение проводилось после дополнительной отмывки клеток. Пунктиром показана остановка восстановления феррицианида при добавлении 1 мМ диэтилдипиридина

системы, восстанавливающие феррицианид, находятся в окружающей среде. Восстановительная активность суспензии клеток по отношению к $K_3[Fe(CN)_6]$ возрастает с увеличением времени инкубации и, таким образом, является мерой количества восстановительных эквивалентов, перенесенных из клеток в окружающую среду за время инкубации.

Для установления связи между скоростью переноса восстановительных эквивалентов в окружающую среду с состоянием энергетической системы клеток были поставлены опыты с KCN, который ингибирует перенос электронов на кислород в цитохромоксидазной реакции и приводит к увеличению уровня восстановленности переносчиков дыхательной цепи митохондрий и других редокс-систем клетки, зависящих от митохондрий. В общем случае это состояние должно благоприятствовать переносу восстановительных эквивалентов на любой доступный окислитель. Действительно, восстановительная активность суспензии, инкубированной с KCN (1 мМ), заметно превышает соответствующий контроль (см. рис. 47, 4). Такой же результат получен при измерении скорости восстановления феррицианида надосадком суспензии клеток, инкубируемых с KCN (см. рис. 47, 4'). Этот факт позволяет считать, что поток восстановительных эквивалентов в окружающую среду определяется внутриклеточным окислительно- восстано-

вительным равновесием и возрастает при ингибировании переноса электронов на естественный акцептор электронов — кислород. Заметим, что восстановительная активность, полученная для надосадка с добавкой KCN, не отличается от таковой в контрольном надосадке (см. рис. 47, 2 и 5). Этот факт позволяет исключить возможный вклад в измеряемый параметр клеточных фракций, содержащих цитохромоксидазные системы и появляющихся в надосадке в результате повреждения клеток в ходе инкубации. Кривые 7 и 6 (см. рис. 47) отражают результаты опытов, в которых использовали суспензии клеток, инкубируемых с KCN и аскорбиновой кислотой, и в которых непосредственно перед измерением была проведена замена надосадка на свежую среду инкубации. Было установлено, что восстановительная активность в таких ресуспендированных клетках заметно выше, чем в суспензии клеток, в которых добавки отсутствовали. Этот опыт показывает, что длительный контакт клеток с KCN и аскорбиновой кислотой приводит к значительным изменениям их метаболической активности, которые сохраняются и после дополнительной отмывки клеток.

Таким образом, используемый методический прием позволяет оценивать изменения восстановительных свойств клеток по отношению к внешним редокс-системам при различных воздействиях на энергетический аппарат клеток. При этом в случае свежотмытых клеток измеряются восстановительные эквиваленты, генерируемые в ходе самого измерения, тогда как измерение, проводимое после инкубации клеток, регистрирует все восстановительные эквиваленты, перенесенные в окружающую среду в процессе инкубации в отсутствие искусственного акцептора. Внесение глюкозы (10 мМ) или таких искусственных акцепторов, как метиленовый синий (10^{-6} М) и феназинметосульфат (10^{-6} М), вызывает резкое увеличение восстановительной активности клеток асцитной карциномы Эрлиха по отношению к феррицианиду калия, так же как это происходит в суспензии эритроцитов.

Опыты с KCN и глюкозой показали, что восстановительная активность асцитных клеток Эрлиха по отношению к феррицианиду определяется метаболической активностью клеток. Восстановительные эквиваленты, переносимые на $K_3[Fe(CN)_6]$, генерируются в ходе окислительного обмена асцитных клеток, поэтому скорость восстановления феррицианида является адекватной характеристикой изменений

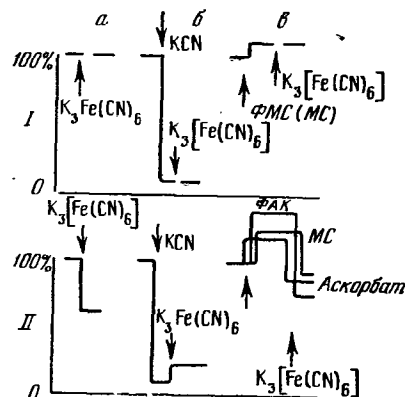
восстановительной активности клеток асцитной карциномы Эрлиха по отношению к внеклеточным акцепторам электронов. Данные по действию аскорбиновой кислоты и метиленового синего обнаруживают качественное сходство с результатами, полученными для суспензии эритроцитов человека, и позволяют предположить участие этих редокс-систем в челночном переносе восстановительных эквивалентов через клеточные мембраны асцитных клеток, так же как это происходит в суспензии эритроцитов. Дитиодипиридин, который быстро окисляет SH-глутатион, останавливает процесс восстановления феррицианида. Этот результат также обнаруживает качественное сходство с данными по влиянию третбутилгидроперекиси на восстановление феррицианида в суспензии эритроцитов.

По современным представлениям SH-глутатион занимает центральное место в регуляции окислительно-восстановительного баланса различных клеток млекопитающих, хотя источники восстановительных эквивалентов, обеспечивающие поддержание уровня восстановленности SH-глутатиона, могут отличаться у разных клеток и у клеток одного типа в зависимости от смены энергетического режима. Обсуждаемый опыт позволяет предположить, что источником восстановительных эквивалентов для восстановления феррицианида в свежееотмытой суспензии являются редокс-системы, обеспечивающие регенерацию глутатиона. Восстановительная активность клеток асцитной карциномы Эрлиха увеличивается при ограничении транспорта электронов на кислород как на уровне НАД-зависимого участка, так и на уровне цитохромоксидазы. Можно предположить, что эти изменения отражают изменившиеся возможности переноса генерируемых клеткой восстановительных эквивалентов на кислород в ходе биоэнергетической трансформации энергии. В этом случае восстановительную активность можно рассматривать как меру «дефицитности» клеток по кислороду.

Этому представлению соответствуют результаты измерения скорости дыхания асцитных клеток при внесении феррицианида (рис. 48). Действительно, феррицианид уменьшает скорость потребления кислорода в суспензии предварительно инкубированных клеток. Этот же эффект сохраняется в присутствии аскорбиновой кислоты и метиленового синего. Выше было показано, что при инкубации асцитных клеток происходит накопление восстановительных эквивалентов в окружающей среде, которое препятст-

Рис. 48. Влияние феррицианида калия на скорость дыхания асцитных клеток Эрлиха

I — свежееотмытая суспензия;
II — суспензия после 1,5 ч инкубации;
а — без добавок;
б — на фоне ингибиторов дыхательной цепи;
в — на фоне искусственных акцепторов электронов



вует дальнейшему их переносу. В этом состоянии весь поток электронов через окислительные системы клетки лимитируется доступностью кислорода. Введение искусственного акцептора феррицианида калия, который может конкурировать с кислородом за электроны, приводит к наблюдаемому уменьшению скорости дыхания. И наоборот, в свежееотмытых клетках суммарный поток генерируемых восстановительных эквивалентов складывается из долей, переносимых на кислород и в окружающую среду. Кислород в этом случае не является лимитирующим фактором окислительного обмена клетки, и внесение феррицианида никак не сказывается на потреблении кислорода (см. рис. 48).

Полученные данные показывают, что транспорт восстановительных эквивалентов в окружающую среду в условиях *in vitro* осуществляется как в присутствии феррицианида, так и без него. Поэтому обмен восстановительных эквивалентов между асцитными клетками и средой можно считать естественным свойством этих клеток и в условиях *in vivo*. Если предположить, что *in vivo* окисление внеклеточных редокс-систем происходит в отделах организма, не занятых опухолью, то перенос восстановительных эквивалентов во внешнюю среду можно рассматривать как еще один дополнительный окислительный процесс, обеспечивающий функцию клеток. Это явление, по-видимому, может приобрести особое значение для клеток, функциони-

рующих в условиях сниженного содержания кислорода, так как наличие обмена восстановительных эквивалентов между гипоксическими клетками различных опухолей и окружающей средой открывает для них дополнительные возможности изменений внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в зависимости от изменений условий окружающей среды. Кроме того, перенос электронов от внутриклеточных восстановительных систем клетки на внешние редокс-системы является путем, альтернативным восстановлению кислорода при участии внутриклеточных терминальных оксидаз. В частности, эта ситуация может реализоваться при контакте клеток с искусственными акцепторами.

Таким образом, асцитные клетки являются удобным объектом для исследования физиологической роли обмена восстановительных эквивалентов между функционирующими в условиях гипоксии клетками и окружающей средой. Будучи аэробными по признакам энергетического метаболизма, клетки асцитных опухолей тем не менее функционируют при гораздо меньших значениях pO_2 , чем остальные клетки и ткани организма-опухоленосителя. В таких гипоксических условиях должно возникать реальное ограничение транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий через цитохромоксидазу. Это ограничение может обеспечить постоянный поток восстановительных эквивалентов из объема, занятого опухолью, к другим тканям и жидкостям организма. В этом случае клетки асцитных опухолей можно рассматривать как объект, использующий обмен восстановительных эквивалентов с окружающей средой для расширения интервала pO_2 , пригодного для существования, в сторону низких значений при одновременном сохранении высокоэффективной системы окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий.

ВОССТАНОВИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СРЕЗОВ ПЕЧЕНИ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФЕРРИЦИАНИДУ КАЛИЯ

Экспериментальные данные, приведенные в предыдущих разделах этой главы, относились только к суспензиям клеток. В связи с этим представлялось интересным выяснить, в какой мере развиваемый подход может быть перенесен на тканевые препараты значительных размеров. Поэтому при сравнении ряда объектов по способности восстанавливать непроникающий в клетки окислитель были выбраны срезы печени — полифункционального органа, одного из наиболее подробно изученных с точки зрения регуляции окислительного метаболизма.

Срезы толщиной 0,3—0,4 мм, приготовленные из печени белых беспородных крыс, после декапитации и последующей быстрой перфузии помещали в среду инкубации, содержащую 1 мМ феррицианида калия. После 20-минутной инкубации при непрерывном встряхивании срезы удаляли, осаждали белки (центрифугированием в присутствии трихлоруксусной кислоты) и измеряли оптическую плотность надосадка. По ее убыли подсчитывали скорость восстановления феррицианида калия.

Оказалось, что срезы печени крысы способны восстанавливать феррицианид калия со скоростью 0,26 нмоль/мг·мин, при этом, так же как и для других исследованных объектов, феррицианид калия не проникает в клетки. Это следует из того, что окисление ферроцианида добавкой марганцовокислого калия в полученный надосадок возвращает величину оптической плотности к исходной, т. е. сумма концентраций ферро- и феррицианида в среде в течение всего времени инкубации сохраняется неизменной.

Для выяснения меры ответственности раневой поверхности среза за восстановление феррицианида калия было проведено сравнение восстановительной активности плоских срезов, кубиков с гранями 2—3 мм и гомогената, приготовленного из равного по весу кусочка печени (табл. 21).

Оказалось, что при 4-кратном изменении отношения поверхности объекта к его весу скорость восстановления феррицианида уменьшается только в 1,5 раза, а не в 4 раза, как это можно было бы ожидать исходя из изменения отношения поверхности к весу. Восстановительная активность гомогената при этом возрастает всего лишь на 74 %.

Таблица 21. Скорость восстановления феррицианида калия в зависимости от отношения площади среза к его весу

Объект	Площадь, мм ²	Скорость восстановления, %
Срезы	100	100
Кубики с размером грани 2—3 мм	20—25	70
Гомогенат	∞	174

Эти оценки позволяют думать, что наличие раневой поверхности не является преимущественным фактором, обуславливающим процесс переноса восстановительных эквивалентов из клеток среза на феррицианид калия.

Оцениваемое количество восстановительных эквивалентов, переносимых на феррицианид, значительно превосходит количество восстановительных эквивалентов, переносимых с SH-глутатионом, который с постоянной скоростью выходит из клеток печени в условиях перфузии [508]. Поэтому можно считать, что именно в условиях окислительной нагрузки повышается выход восстановительных эквивалентов из клеток печени в окружающую среду. Это позволяет констатировать наличие у клеток печени способности влиять на окислительно-восстановительный потенциал окружающей среды, подобно тому как это было раньше показано для эритроцитов, дрожжей и аспитных клеток. Эти факты создают основу для рассмотрения возможной роли обмена восстановительных эквивалентов между клетками ткани как фактора, участвующего в регуляции кислородзависимых процессов в клетке.

В отличие от эритроцитов в клетках печени уровень восстановленности SH-глутатиона поддерживается не только за счет работы ГМФШ. В настоящее время различные авторы чаще всего указывают на такие источники регенерации цитоплазматического НАДФН и связанного с ним SH-глутатиона, как трансгидрогеназная, изопитрат- и глутаматдегидрогеназные реакции, а также реакция, катализируемая малик-ферментом [442].

Несмотря на то что участие различных источников генерации НАДФН в клетках печени может сильно варьировать в зависимости от конкретной ситуации, зависимость флуоресценции пиридиновых нуклеотидов в гепатоцитах от содержания SH-глутатиона носит линейный характер. Этот факт позволяет сравнить действие субстратов дыха-

тельной цепи митохондрий на скорость восстановления феррицианида срезами печени с изменением флуоресценции пиридиновых нуклеотидов при тех же воздействиях [442], чтобы установить зависимость исследуемого параметра от состояния НАДФН-регенерирующей системы клеток печени. Оказалось, что сукцинат увеличивает восстановление феррицианида срезами печени в соотношениях, наблюдаемых и при изменении им флуоресценции пиридиновых нуклеотидов. Кроме того, сукцинат всегда предотвращает снижение содержания SH-глутатиона в срезах, обусловленное окислительной нагрузкой, которую создает присутствие феррицианида в среде инкубации.

Это отвечает данным флуоресцентных измерений, показавшим, что сукцинат уменьшает падение SH-глутатиона в гепатоцитах в условиях окислительной нагрузки, создаваемой присутствием третбутилгидроперекиси. Ингибитор гликолиза NaF не приводит к изменению скорости восстановления феррицианида срезами, что позволяет исключить возможный вклад гликолитических кофакторов в генерацию восстановительных эквивалентов, переносимых на феррицианид. Это предположение отвечает тому, что при снижении содержания SH-глутатиона в гепатоцитах добавлением трибутилгидроперекиси отношение концентраций компонент в парах лактат/пируват и β -гидроксипират/ацетоацетат остаются неизменными [442].

Другим указанием на тесную связь между скоростью восстановления феррицианида срезами и активностью НАДФН-регенерирующей системы клеток являются данные по изменению содержания SH-глутатиона в ходе переживания изолированных срезов, показавшие, что снижение уровня SH-глутатиона и скорости восстановления феррицианида происходит параллельно в начальном периоде переживания срезов. Этот результат позволяет провести сравнение «флуоресцентного» и «феррицианидного» методов по качеству получаемой информации. Для этого необходимо сравнить количество восстановительных эквивалентов, переносимых на феррицианид за время измерения, с содержанием SH-глутатиона. Восстановительные эквиваленты, соответствующие НАДФН, можно не принимать во внимание при такой оценке, поскольку концентрация SH-глутатиона на несколько порядков превышает содержание НАДФН.

Содержание SH-глутатиона в срезах печени в 4—5 раз меньше, чем количество восстановительных эквивалентов,

переносимых на феррицианид за 20 мин. Еще большую разницу можно получить в присутствии сукцината: SH-глутатион в этих условиях увеличивается незначительно, тогда как количество восстановленного феррицианида увеличивается примерно в 4 раза, что в итоге дает 15–20-кратную разницу между сравниваемыми количествами восстановительных эквивалентов. Из этой оценки следует, что если флуоресцентный метод, измеряющий уровень восстановленности пиридиновых нуклеотидов, позволяет оценивать изменения окислительно-восстановительного потенциала соответствующей системы, то количество восстановленного феррицианида соответствует потоку восстановительных эквивалентов, переносимых через эту систему, и может служить суммарной характеристикой потенциальной восстановительной активности клеток печени.

Какова же связь между процессами обмена восстановительных эквивалентов между клеткой и средой с кислородозависимым окислением в клетке?

При ограничении транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий происходит заметное увеличение скорости восстановления феррицианида калия срезами печени. Так, ингибитор цитохромоксидазы — цианистый калий — в концентрации 1 мМ вызывает увеличение измеряемого параметра на 50–80% при одновременном подавлении скорости дыхания на 70–80%. При внесении ингибитора НАД-зависимого участка амиталя скорость восстановления увеличивается на 10–30% при подавлении дыхания на 30–40%. Эти результаты просто интерпретируются с точки зрения конкуренции между феррицианидом и кислородом за восстановительные эквиваленты, поступающие в систему SH-глутатиона. С этих позиций следует ожидать также увеличения скорости восстановления феррицианида при уменьшении содержания кислорода в среде инкубации. Действительно, при уменьшении pO_2 от 160 до 5–10 мм рт. ст. происходит увеличение скорости восстановления феррицианида приблизительно на 200%. Таким образом, зависимость регистрируемого параметра от pO_2 может служить мерой ограничения окислительного обмена доступностью кислорода, подобно тому как это было рассмотрено для асцитных клеток.

Важным, на наш взгляд, обстоятельством является «зеркальное» совпадение зависимостей скорости восстановления феррицианида и скорости дыхания от pO_2 у различных объектов. В области «критических» концентраций

кислорода, при которых отмечается быстрое падение скорости дыхания у разных объектов, происходит также и быстрое увеличение скорости восстановления феррицианида. Для таких объектов, как асцитные клетки, дрожжи или митохондрии, критические концентрации кислорода лежат в области, меньшей чем 2–3 мм рт. ст. При таких концентрациях снятие зависимости скорости дыхания от pO_2 становится затруднительным по чисто техническим причинам. Эти результаты позволяют заменить измерение скорости дыхания на определение скорости восстановления феррицианида калия в этой области, что является значительным техническим упрощением, поскольку снижаются требования к герметичности кюветы, и достаточно обеспечить лишь стационарные условия по кислороду. С другой стороны, зависимость скорости восстановления феррицианида калия от pO_2 может быть использована как характеристика «степени гипоксии» для любого объекта *in vitro*. Более детальное обсуждение взаимоотношения между переносом восстановительных эквивалентов из клеток в окружающую среду и на кислород проведено в разделе, посвященном суспензии асцитных клеток. Поэтому отметим лишь, что, судя по полученным данным, в общих чертах эти соображения могут быть перенесены и на любые другие тканевые препараты.

Резюмируя сказанное, можно считать, что обсуждаемый материал позволяет констатировать наличие обмена восстановительных эквивалентов между клетками печени и окружающей средой и тесную связь этого процесса с активностью НАДФН-регенерирующих систем гепатоцитов. Использование «феррицианидного метода» может расширить возможность изучения окислительно-восстановительного баланса клеток и тканевых препаратов *in vitro*, поскольку наряду с такими характеристиками окислительно-восстановительного баланса клеток, как уровень SH-глутатиона и флуоресцентные измерения восстановленности кофакторов окислительного обмена, появляется возможность измерения потока восстановительных эквивалентов через эти редокс-системы при различных взаимоотношениях кислородозависимых систем клетки. Развитие этого подхода на данный момент зависит, по-видимому, от детального исследования механизма транспорта восстановительных эквивалентов через мембрану клеток конкретного вида. В случае эритроцитов или асцитных клеток аскорбиновая кислота является эффективным переносчиком восстановительных

эквивалентов через мембрану, позволяющим снимать «узкое место» в транспорте восстановительных эквивалентов и количественно дозировать окислительную нагрузку и соответственно получать оценку максимальной мощности восстановительной системы, как это было показано для эритроцитов с дефицитом активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

* * *

Различные типы клеток обладают способностью продуцировать во внешнюю среду восстановительные эквиваленты. В эритроцитах, дрожжах и асцитных клетках преимущественными источниками, по-видимому, являются восстановители, связанные с системой глутатиона. В клетках печени роль источников восстановительных эквивалентов, связанных с дыхательной цепью митохондрий, повышается по сравнению с другими рассмотренными объектами. В аэробных клетках их восстановительная активность по отношению к внеклеточной редокс-системе зависит как от уровня восстановленности внутриклеточных редокс-систем, так и от метаболической активности клеток. Транспорт восстановительных эквивалентов через клеточную поверхность увеличивается при ограничении в дыхательной цепи транспорта электронов на кислород. Таким образом, восстановительную активность клеток можно рассматривать как меру «дефицитности» клеток по кислороду, а перенос восстановительных эквивалентов через клеточную мембрану есть путь, альтернативный восстановлению кислорода при участии терминальных оксидаз. Этот путь может быть использован клетками в гипоксических условиях, когда создаются реальные условия для ограничения транспорта электронов в дыхательной цепи через цитохромоксидазу и увеличения степени восстановленности внутриклеточных кофакторов окислительного обмена.

ПРИЛОЖЕНИЕ

МЕТОДЫ ПРИЖИЗНЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРЕБРАЩЕНИЙ В КИСЛОРОДЗАВИСИМЫХ РЕАКЦИЯХ

Полярографическое определение скорости дыхания клеточно-тканевых препаратов

Метод полярографического определения скорости утилизации кислорода с помощью твердых электродов первоначально был развит применительно к суспензиям изолированных митохондрий. Измерение скорости дыхания клеточно-тканевых препаратов требует внесения некоторых дополнений в конструкцию измерительных ячеек из-за необходимости предусмотреть возможность введения и фиксации специального держателя для тканевых срезов и кусочков. Регистрация дыхания срезов, как правило, проводится при температурах 35–37° С. Поэтому необходимо термостатирование ячейки. Объем ячейки определяется размерами срезов либо количеством изолированных клеток. Скорость потребления кислорода клеточно-тканевыми препаратами колеблется в пределах 0,5–5 нмоль·мин⁻¹ мг⁻¹ (см. табл. 9).

Герметичная полярографическая ячейка — наиболее распространенный тип кювет в настоящее время. Для навески ткани в 3–5 мг удобно пользоваться ячейкой объемом 1–1,5 мл, в которой легко обеспечивается равномерное перемешивание среды и длительное (20–35 мин) проведение эксперимента при довольно высоких значениях рО₂ в растворе (70–40% от исходного). При работе со срезами используется вилочковый держатель (на который одевается кусочек), или рама (в которую он зажимается), или нейлоновый сачок.

Открытая полярографическая ячейка. В отличие от широко распространенной в практике герметичной полярографической ячейки, открытая полярографическая ячейка позволяет регистрировать скорость потребления кислорода

клеточно-тканевыми препаратами при стабильном поддержании заданных значений pO_2 в растворе. Это является ее основным принципиальным преимуществом, компенсирующим некоторую инертность регистрируемого ответа. Благодаря созданию стационарных по кислороду условий инкубирования препаратов в открытой полярографической ячейке концентрация кислорода перестает быть лимитирующим фактором, в связи с чем время регистрации дыхания может быть столь угодно продолжительным (1–1,5 ч). Это очень существенно при работе с клетками и срезами, когда кислородзависимые реакции отражают функцию множественных процессов и стабилизация дыхания после метаболических воздействий требует значительно больше времени, чем для изолированных митохондрий. Частным случаем является измерение, когда раствор в рабочем объеме ячейки свободно обменивается кислородом с внешней средой.

Возможно также продувание над ячейкой с помощью перфузионного насоса газовой смеси нужного состава, что позволяет осуществлять эксперимент в заданной узкой области значений pO_2 .

В литературе описаны различные конструкции полярографических ячеек с регулируемой подачей газа, отличающиеся способом перемешивания раствора и характером поверхности, контактирующей с газовой фазой [4а, 74а].

Наиболее простая и удобная модификация открытой полярографической ячейки была предложена в нашей лаборатории С. В. Харадуровым.

Предотвращение потерь раствора через испарение и достаточный уровень газообмена с окружающим воздухом обеспечиваются в ней оптимальными размерами и режимом перемешивания. Кювета представляет собой термостатируемый цилиндр диаметром 1,5–2,5 см и высотой около 4 см; объем заливаемого раствора составляет 0,8–2 мл. Потери раствора за время 1–1,5 ч практически несущественны; pO_2 раствора регистрируют с помощью вставленного сверху или сбоку электрода кларковского типа; он обеспечивает также турбулентность потока, при которой внесение срезов в раствор не влияет на режим перемешивания.

Проведение эксперимента в открытой полярографической ячейке заключается в следующем. В ячейку заливается раствор, опускается электрод и после установления стабильных значений предельного тока ($I_{пр}$), пропорциональных концентрации растворенного в растворе кислорода

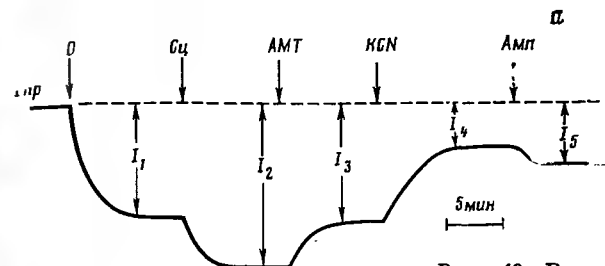


Рис. 49. Вид полярографической записи дыхания в открытой полярографической ячейке (а) и график для определения константы ячейки (K_d) (б)

а — изменение $I_{пр}$ (пропорционального pO_2 в растворе) в присутствии дышащего объекта (О) и различных добавок; б — изменение тока электрода ($I_{пр}$) и его восстановления при насыщении раствора кислородом.

Остальные объяснения и расчет в тексте

и уравновешенного по его содержанию в окружающей газовой фазе, вносится объект (митохондрии, клетки, гомогенаты, срезы). Исходная величина $I_{пр}$, регистрируемая кларковским полярографическим электродом, снижается и переходит на новый стационарный уровень, характеризующийся величиной тока I_n (рис. 49). Различные метаболические добавки, меняя интенсивность потребления кислорода препаратом, будут влиять на уровень соответствующего стационарного дыхания, увеличивая или уменьшая величину измеряемого тока относительно $I_{пр}$ (что соответствует усилению или торможению потребления кислорода).

Абсолютная скорость дыхания при концентрации кислорода в растворе, уравновешенной с окружающей газовой фазой, рассчитывается по формуле

$$V_d = \frac{CM\Delta I_n}{PI_{пр}} K_d, \quad (39)$$

где C — количество кислорода, содержащегося при данном режиме работы в данном объеме; M — объем ячейки (мл); P — вес препарата (мг); $I_{пр}$ — исходная величина тока (предельный ток), регистрируемая кислородным электро-

дом до помещения дышащего объекта в открытую полярографическую ячейку; ΔI_n — разность между $I_{пр}$ и значениями тока после установления нового стационарного режима, соответствующего скорости потребления кислорода; K_d — константа, зависящая от размеров кювета и интенсивности перемешивания раствора, определяемая эмпирически. Расчет K_d производится следующим образом. Через ячейку продувается инертный газ (азот) до тех пор, пока содержание кислорода в растворе не снизится практически до нуля. В этот момент подача азота прекращается и кислород диффундирует в ячейку до тех пор, пока не наступит динамическое равновесие между раствором и атмосферой воздуха (см. рис. 49). Считая, что нарастание концентрации кислорода подчиняется экспоненциальному закону, а предельный ток прямо пропорционален ей, можно записать:

$$I_n = I_{пр} (1 - e^{-K_d t_n}), \quad (40)$$

или после преобразования

$$\ln \frac{I_{пр}}{I_{пр} - I_n} = K_d t_n. \quad (41)$$

По экспериментально измеренным значениям I_n для момента времени t_n (см. рис. 49) с помощью формулы (41) находится величина K_d .

Система для регистрации скорости поглощения кислорода тканевыми препаратами с автоматически регулируемой подачей кислорода (pO₂-стат).

Регулируемым параметром является средняя скорость диффузии кислорода, зависящая от деления постоянного временного периода T (порядка нескольких секунд) на интервалы T и $T - \Delta T$. В течение времени ΔT свободная поверхность контролируемого раствора в измерительной ячейке открыта, что обеспечивает возможность диффузии атмосферного кислорода в жидкий объем ячейки. В течение интервала времени $T - \Delta T$ диффузия кислорода прекращается с помощью крышки, опускаемой в ячейку вплотную к свободной поверхности жидкого объема. Деление периода T на интервалы T и $T - \Delta T$ осуществляется системой управления и определяется разностью измеряемой и заданной концентраций кислорода. При увеличении или уменьшении скорости дыхания автоматически уменьшается или увеличивается доля времени $\Delta T/T$,

в течение которой осуществляется диффузия кислорода в контролируемый раствор, что обеспечивает поддержание концентрации кислорода в ячейке на заданном уровне.

Для быстрого снятия кривых зависимости скорости дыхания от концентрации кислорода можно применять ячейку, в которую введены два электрода Кларка. Она имеет следующее устройство. В боковой стенке укрепляется электрод для измерения pO₂ раствора. На расстоянии 10–15 мм от свободной поверхности жидкости в верхнюю герметизирующую крышку вмонтирован второй такой же электрод, измеряющий концентрацию O₂ в свободной от раствора части кюветы. В верхней крышке имеются отверстия для ввода и выхода порций газа (азота, воздуха). Через некоторое время после внесения объекта в ячейку устанавливается стационарный режим, при котором скорость поступления кислорода из свободного объема в раствор равна скорости потребления кислорода объектом. В этих условиях скорость дыхания прямо пропорциональна разности концентраций кислорода в газовой смеси и растворе.

Флуорометрические методы исследования окислительно-восстановительных превращений в живых тканях

Окисленные и восстановленные формы ряда ферментов и коферментов, участвующих в переносе электронов от органических субстратов к молекулярному кислороду, обладают характерными спектрами поглощения (абсорбции) и флуоресценции, которые могут быть измерены и зарегистрированы с помощью специальной аппаратуры. Такими свойствами обладают: коферменты пиридинзависимых дегидрогеназ — пиридиновые нуклеотиды НАД и НАДФ; протестическая группа флавинзависимых дегидрогеназ — флавопротеиды ФАД или ФМН; цитохромы, содержащие железопорфириновую колебательную систему.

Регистрация абсорбционных спектров в таких гетерогенных полидисперсных системах, как клетка, имеет серьезные ограничения, связанные, во-первых, с помехами светорассеяния в них и, во-вторых, с многокомпонентностью результирующего спектра поглощения. Значительно проще поддаются анализу данные, получаемые с помощью флуоресцентной спектроскопии, обладающей очень высокой чувствительностью. Динамика спектров флуоресценции позволяет проследить окислительно-восстанови-

тельные переходы, обусловленные работой функциональных механизмов в клетке. Впервые флуоресценция клеток в синем свете исследовалась Варбургом [577]. В 1956—1958 гг. Чанс с сотрудниками на основании спектрофото- и флуорометрических исследований установил связь между флуоресценцией живых клеток и тканей и процессами, сопутствующими изменению количества восстановленных пиридиннуклеотидов в митохондриях [144, 164, 167]. В этих исследованиях было показано, что способностью к флуоресценции обладают восстановленные формы пиридиновых нуклеотидов НАД⁺ и НАДФ⁺ (НАДН и НАДФН) и окисленные формы флавопротеидов ФАД⁺ и ФМН⁺.

НАД⁺ и НАДФ⁺ обнаруживаются во всех типах клеток. В клетках печени около 60% общего количества НАД⁺ находится в митохондриях, а остальные 40% — в цитоплазме. НАДФ⁺ распределяется противоположным образом — в растворимой фракции цитоплазмы содержится большее его количество, чем в митохондриях.

Восстановленная и окисленная формы НАД и НАДФ обладают существенно различными свойствами. Так, их окисленные формы имеют один резкий минимум поглощения при 260 нм; восстановление НАД⁺ и НАДФ⁺ сопровождается появлением полосы поглощения в области 340 нм, уменьшением полосы 260 нм и интенсивной флуоресценцией в синей области. Максимум флуоресценции НАДН лежит в области 445 нм, а максимум НАДФН — в области 463 нм. При переходе НАДН и НАДФН в окисленное состояние они теряют способность флуоресцировать.

Большинство пиридинзависимых дегидрогеназ специфично либо в отношении НАДН, либо в отношении НАДФН. Однако некоторые из них, например глутаматдегидрогеназа, могут использовать оба эти кофермента. При связывании НАДН и НАДФН с их дегидрогеназами линия флуоресценции сдвигается в сторону увеличения коротких волн до 440 нм и ее интенсивность возрастает.

НАД⁺ является первым акцептором электронов и протонов, отнимаемых от окисляемого вещества, в дыхательной цепи. Через него происходит окисление большинства субстратов цикла Кребса. Исключение составляют гидрогенизация изолимонной кислоты и окисление янтарной кислоты. В первом случае акцептором водорода является НАДФ⁺, вторично восстанавливающий НАД⁺. Следует учитывать также, что НАД⁺ и НАДФ⁺ могут быть связаны

с молекулами соответствующих ферментов, находящихся в цитозоле. Поэтому информация об изменении уровня НАД⁺/НАДН может оказаться решающей для понимания хода многих метаболических реакций. Измеряя флуоресценцию НАДН в отдельной клетке или ткани и добываясь с помощью специфических ингибиторов альтернативного исключения или перекрытия какого-либо метаболического пути (или функционального участка), можно таким образом оценить его значимость в общем фонде метаболических реакций.

Процессы окисления—восстановления флавинзависимых дегидрогеназ, как указывалось выше, сопровождаются также характерными изменениями спектра флуоресценции. При этом люминесцируют только окисленные формы флавиновых коферментов (520—530 нм). Регистрации кинетических изменений флуоресценции ФАД⁺ (ФМН⁺) представляется чрезвычайно важной при исследовании работы дыхательной цепи в изолированных системах (митохондриях) и в интактной клетке. Ценность такого рода работ возрастает при одновременной регистрации флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов. Дело в том, что 90% флуоресценции флавопротеидов обеспечивается митохондриальными фракциями. Следовательно, в отличие от пиридиннуклеотидов, локализованных в разных клеточных компартментах (в клетках печени около 55% пиридиннуклеотидов находится в митохондриях и 45% в цитозоле), окислительно-восстановительные превращения флавопротеидов будут относиться лишь к одному функциональному пулу. Одновременный анализ флуоресценции НАД(Ф)Н и флавопротеидов дает чрезвычайно ценную информацию о взаимодействии метаболических путей в разных отделах клетки.

Первый прибор, названный микроспектрофлуориметром и позволявший производить прижизненную регистрацию флуоресценции, был сконструирован Чансом с сотрудниками [161]. Создание ординарной установки в настоящее время возможно в условиях любой лаборатории [26]. Из серийных приборов, выпускаемых в нашей стране, можно назвать микроспектрофлуориметр и фотометр МФТХ-1, а также микроскопы МЛИ-2 и МЛИ-3. Дальнейшее развитие этого метода с использованием световолоконной оптики позволило измерить флуоресценцию НАДН с поверхности мозга в условиях многодневного хронического эксперимента [152].

Методически очень ценно при микрофлуориметрических исследованиях использование внутриклеточного микроэлектрофореза для инъекции метаболитов. Этот прием был впервые применен в работах Картиса [189]. Смысл его применения — в возможности обходиться малыми количествами вещества и осуществлять контролируемое воздействие на объект, физиологически адекватный их концентрациям.

Новым этапом технического развития является одно- и многоканальная количественная регистрация уровня НАД⁺/НАДН в отдельных клетках, продемонстрированная в большой серии работ [38, 339—342]. Двухканальный вариант получил очень широкое распространение. Выбрав в качестве одного из участков «митохондриальный» район клетки, а в качестве другого — цитоплазматический, исследователь имеет возможность определить сравнительный ход метаболических реакций качественно и количественно практически в реальном времени. Микроспектрофлуориметр может работать в двух режимах. При «спектральном» режиме свет флуоресценции разлагается в спектр так, что на каждую группу каналов (10—15), соединенных параллельно, приходится спектральный участок шириной 5—8 нм; это соответствует приблизительно точкам отсчета на клетке. При «топографическом» режиме луч люминесценции от одного из 20—30 участков клетки попадает на одну группу каналов. Таким образом, на выходе возникает распределение интенсивности свечения по клетке. Общее время сканирования доведено до 32 с. Возможность сверхбыстрой регистрации в отдельных компартментах клетки определяет фактическую ценность метода. Измеряя время полувосстановления НАДН в этих компартментах, можно установить очередность метаболического ответа. Так, например, в асцитных клетках [340] при введении глюкозо-6-фосфата изменение редокс-состояния начиналось в цитоплазме в среднем на 200 мс позднее, чем в ядре, но на 300 мс раньше, чем в «митохондриальном» районе клетки.

Если вводить добавки субстрата малыми последовательными дозами [340, 342], скорость утилизации субстрата может быть оценена как функция времени цикла окисления-восстановления НАД⁺/НАДН. Зная матрицу этих времен для всего пространства клетки, можно увидеть и пространственную динамику утилизации субстрата внутри клетки. Возможности подобной системы очень велики. Регистрируя флуоресценцию НАДН или какого-либо другого

флуорохрома, мы имеем фактический биохимический «портрет» клетки в реальном времени.

Исследование флуоресценции окисленных и восстановленных форм НАДН и флавопротеидов показало наличие сильной температурной зависимости величины квантового выхода в обоих случаях. Так, интенсивность флуоресценции НАДН в суспензии митохондрий увеличивается в 14 раз при охлаждении до температуры -196°C по сравнению с комнатной температурой, при этом наблюдается незначительное смещение максимума излучения — от 462 до 457 нм при возбуждении на волне 366 нм [159]. В замороженных образцах ткани наблюдалось подобное увеличение: интенсивность возрастала приблизительно в 9 раз, а пик максимума смещался от 467 к 454 нм. Аналогичное изменение претерпевает и люминесценция окисленных флавопротеидов.

Поэтому очень перспективным представляется предложенный Чансом с соавторами [159] способ оценивать редокс-состояние митохондрий на основе измерения отношения интенсивностей люминесценции митохондриальных пулов пиридиннуклеотидов и флавопротеидов при температуре -196°C . Суть этого метода заключается в следующем. Сначала проводится калибровка регистрируемой интенсивности люминесценции. Для этого фиксируется ее значение: во-первых, при условиях, когда дыхательные переносчики полностью восстановлены и, следовательно, регистрируется максимальная интенсивность люминесценции НАДН; во-вторых, когда дыхательная цепь полностью окислена и, таким образом, возникает максимальная люминесценция флавинов; в-третьих, для среды инкубации ткани или митохондрий. Затем усиление сигналов в каждом из каналов регистрации для НАДН и флавинов регулируется таким образом, что за нуль принимается сигнал от инкубационной среды, а за единицу — максимальная интенсивность люминесценции. Диапазон изменений выходного сигнала в обоих каналах одинаков, и величина отношения двух сигналов, таким образом, соответствует нормированному отношению изменения интенсивностей люминесценции пула пиридиннуклеотидов и флавинов [159].

Принципиально важным моментом является то обстоятельство, что измеренная таким образом величина отношения НАДН/ФП не только отражает изменение редокс-состояния митохондрий, но значительно меньше зависит от

различных факторов, влияющих на точность измерения. Известно, например, что содержания белка в препарате влияет на интенсивность флуоресценции. Кроме того, при измерениях в условиях *in vivo* и на тканевых препаратах люминесценция зависит и от концентрации гемоглобина. Редокс-отношение, измеренное при температуре -196° , зависит от содержания белка в митохондриях намного меньше, чем люминесценция НАДН или флавинов, регистрируемая отдельно. Присутствие же гемоглобина, добавленного к суспензии митохондрий или имеющегося в перфузате в физиологических концентрациях (для ткани), оказывает такое же компенсаторное действие.

При изменении функционального состояния (например, переход от состояния 2 к состоянию 4 или от нормоксии к гипоксии) наблюдается значительное изменение указанного редокс-отношения в присутствии гемоглобина в концентрациях, при которых интенсивность люминесценции НАДН и флавинов, регистрируемая по отдельности, изменяется мало из-за гемоглобинзависимого поглощения флуоресценции и возбуждающего света.

Высокая результативность применения этого способа оценки редокс-состояния дыхательной цепи показана только для низких температур. Основные ограничения связаны с низкой интенсивностью флуоресценции флавинов. Можно ожидать, однако, что использование современной лазерной техники для возбуждения люминесценции, с сопутствующим увеличением ее интенсивности и повышением монохроматичности откроет новые возможности для проведения прижизненных наблюдений окислительно-восстановительных превращений в клетке.

Флуоресцентное измерение pO_2 в клетках и тканях

В 1970 г. Воутхам и Вебер [567] показали, что пирен-3-битуровая кислота (ПБК) флуоресцирует в водном растворе и ее флуоресценция уменьшается в присутствии кислорода в среде, подчиняясь классическому уравнению Стерна — Волмера:

$$F_0/F = 1 + q pO_2, \quad (42)$$

где F_0 — интенсивность флуоресценции при $pO_2 = 0$; F — измеряемая флуоресценция; q — коэффициент тушения. Мак-

симум возбуждения лежит в районе 340 нм, а максимум свечения — в районе 370 нм.

За последние годы появился ряд публикаций, в которых рассмотрены вопросы, касающиеся возможности использования ПБК в качестве экзогенного флуоресцентного зонда на кислород [369]. Время жизни флуоресценции более 100 нс, и это вполне достаточно, чтобы обеспечить точное измерение pO_2 в любых биологических процессах. Специальные эксперименты [411] показали, что ПБК быстро и легко проникает в клетки самых разных тканей. При столкновении молекул ПБК и O_2 происходит тушение люминесценции. Таким образом, изменения внутриклеточного pO_2 из-за присутствия молекул ПБК не происходит. ПБК не оказывает токсического действия на ткани даже при длительном (до 6 недель) ее введении в организм животного [45] в концентрации порядка $(5 \div 20) \times 10^{-6} M$, которой вполне достаточно для регистрации флуоресценции ПБК. Ее присутствие не оказывает влияния на метаболический статус ткани. ПБК не изменяет редокс-состояние НАДН, цитохромов b и c.

По-видимому, в митохондриальном пространстве клетки нет соединений, которые могли бы эффективно гасить люминесценцию ПБК. KCl, $MgCl_2$, CO, CO_2 , глюкоза, ионы водорода, инертные газы и ряд других веществ не влияют на флуоресценцию ПБК. Однако есть вещества, способные к активному гашению, хотя в несколько раз менее эффективно (в основном это соли некоторых металлов — $FeCl_3$, $NiCl_3$), и это необходимо учитывать при измерении pO_2 в процессе метаболических превращений ксенобиотиков в клетке.

В последнее время Грюневальд и Люберс [258—260] разработали криомикрофотометрический метод определения внутрикапиллярного насыщения и последующей оценки напряжения pO_2 в ткани. Этот метод основан на том, что при быстром охлаждении насыщение гемоглобина кислородом не изменяется [258]. После охлаждения из ткани готовят тонкие (10—15 мкм) срезы. Таким образом, толщина среза определяет интервал дискретизации в измеряемом распределении pO_2 вдоль капилляра. Охлажденные срезы помещают в микроскоп-криостат и сохраняют при температуре $-100^{\circ} C$. Микроскоп объединен с двухволновым фотометром. Диаметр рабочего поля в задиафрагмированном объективе — 2—8 мкм, экстинкция гемоглобина измеряется в спектральном диапазоне между

520 и 620 нм. Измеренные спектры поглощения гемоглобина обрабатываются с помощью развитого авторами [380] метода. Сущность последнего заключается в том, что измеренный спектр HbO_2 представляется в виде линейной комбинации трех базисных спектров: спектра поглощения оксигенированного гемоглобина при температуре -100°C , деоксигенированного гемоглобина при той же температуре, а также деоксигенированного и дегидрированного гемоглобина, который образуется в процессе формирования кристалликов льда при замораживании.

Возможности метода могут быть расширены, если его применить к миоглобинсодержащим тканям. Значительные технические трудности, возникающие при попытке дифференцировать поглощение O_2 миоглобином и гемоглобином, вынуждают ограничиваться в этом плане объектами, где природа индикатора не вызывает сомнения. С помощью криомикрофотометрии удалось измерить частотное распределение насыщения гемоглобина внутри капилляра в миокарде [236], поле распределения для O_2 в мышечной ткани [243]. Оборудование для обеспечения подобной методики измерения, конечно, сложнее, нежели при полярографическом определении pO_2 , но надо отметить, что все элементы этого оборудования уже давно стали атрибутами лабораторной практики современных исследований.

Другое направление в технике измерения прижизненного клеточного pO_2 базируется на идее использования кислородной зависимости окислительно-восстановительного состояния дыхательных переносчиков и активности некоторых ферментов.

В одной из первых таких работ для определения величины pO_2 в митохондриях было предложено использовать флуорометрическое определение степени восстановленности НАД⁺. Основанием явился тот факт, что при концентрациях кислорода 10^{-7} M , соответствующих $\text{pO}_2 = 7 \cdot 10^{-2} \text{ мм рт. ст.}$, наблюдается 50%-ное восстановление митохондриального пула пиридиннуклеотидов. В процессе перехода от аноксии к нормоксии уровень восстановленности снижается до 25%. Таким образом, превышение определенного уровня восстановленности НАДН в митохондриях свидетельствует о падении концентрации кислорода ниже критического значения.

Присутствие гемоглобина мало влияет на уровень регистрируемого сигнала, так как увеличение поглощения возбуждающего света комплексом гемоглобин—кислород ком-

пенсировается увеличением поглощения света люминесценции.

Для индикации митохондриального значения pO_2 может применяться спектрофотометрия в отраженном свете состояния цитохромов c и a_3 .

Новые возможности открываются, если проводить одновременную регистрацию оптических характеристик кислородных индикаторов, характерных только для цитозоля и только для митохондрий, например спектр поглощения миоглобина и флуоресценцию НАДН или флавинов. Соответствующая обработка результатов позволяет получить информацию о градиенте напряжения кислорода для различных компартментов клетки. Такой способ измерения, интенсивно развиваемый в последнее время, получил название метода двух индикаторов.

Условием применимости метода является возможность уверенной регистрации состояния каждого индикатора. Так, использование пары цитохром — миоглобин было успешно применено для регистрации градиента O_2 *in vitro* для суспензии митохондрий сердца [155], однако *in vivo* на перфузируемом сердце этот метод не мог дать результата, так как скорость дыхания очень велика и малы концентрации окисленных цитохромов и деоксимиоглобина, а величины P_{50} (pO_2 , соответствующее 50%-ному насыщению MbO_2 и 50%-ному окислению цитохрома c) отличаются мало. Для покоящейся скелетной мышцы, где скорость дыхания значительно ниже, использование этой пары индикаторов вполне оправдано.

Для исследования распределения pO_2 в клетках перфузируемой печени использовалась пара цитохром c оксидаза (митохондрии) — уратоксидаза (пероксисомы), имеющая существенно разную величину K_m (0,1 мкм и 0,1 мМ соответственно). (Об активности уратоксидазы судят по образованию комплекса H_2O_2 —каталаза в присутствии метанола.) В качестве другого цитозольного индикатора может быть использована и гликолатоксидаза ($K_m = 0,3 \text{ мМ}$) [509].

Применение метода двух индикаторов только начинается, но уже сейчас можно предположить, что именно такой подход даст возможность получить достоверную информацию о значениях pO_2 в клетках и градиентах pO_2 между их компартментами в условиях *in vivo* и *in vitro* при различных функциональных состояниях клеток.

Потенциометрическое измерение скорости восстановления феррицианида калия в суспензии эритроцитов человека

Регистрация окислительно-восстановительного потенциала среды инкубации, содержащей клетки или срезы ткани, может осуществляться при использовании измерительных платиновых электродов и хлорсеребряных электродов сравнения, входящих в комплект лабораторных рН-метров. В качестве усилителя напряжения с высоким входным сопротивлением могут быть использованы рН-метры различных марок либо специальные усилители, например электрометрический вольтметр ВК-2-16, обладающий входным сопротивлением, большим, чем 10^{12} Ом, что позволяет заметно уменьшить площадь рабочей поверхности измерительного электрода. Желательно, чтобы термостатирование кюветы, в которой происходит измерение, допускало возможность параллельной регистрации pO_2 с помощью полярографического электрода Кларка, рабочий объем которого электрически изолирован от среды инкубации. Потенциометрическое измерение скорости восстановления феррицианида калия начинается с момента внесения порции $K_3[Fe(CN)_6]$ в среду инкубации. Временная зависимость окислительно-восстановительного потенциала регистрируется на самопишущем потенциометре (см. рис. 41) и может быть использована для подсчета количества ферроцианида в среде инкубации в любой момент времени. Подсчет ведется по формуле, которую можно получить из уравнения для окислительно-восстановительного потенциала системы ферро-/феррицианида:

$$C_{K_3} [Fe(CN)_6] = \frac{C_0}{1 + 10 \frac{E_t - E_0 + E_{AgCl}}{60}}, \quad (43)$$

где C_0 — исходная концентрация ферроцианида; E_0 — стандартный окислительно-восстановительный потенциал системы ферро-/феррицианид; E_t — значения окислительно-восстановительного потенциала в каждый момент времени; E_{AgCl} — потенциал электрода сравнения.

Такая обработка позволяет использовать кривые, изображенные на рис. 41, для оценки скорости восстановления феррицианида калия по графикам, представленным на рис. 42 или 43. Для получения сравнительных характеристик достаточно измерить время, необходимое для восста-

новления одинаковых порций феррицианида, как это было описано в разделах, посвященных клеткам дрожжей или асцитной опухоли Эрлиха.

Одной из практических задач, в которой может быть использован описываемый метод, является изучение взаимодействия лекарственных средств широкого применения с восстановительными системами эритроцитов. Так, например, производные нитрофурана или нитроимидазола относятся к соединениям с электронакцепторными свойствами. Подобно аскорбиновой кислоте или метиленовому синему, они могут восстанавливаться клетками и вслед за тем окисляться, взаимодействуя с молекулярным кислородом. Эти соединения сами не способны устанавливать потенциал на платиновом электроде, поэтому их действие на скорость восстановления феррицианида можно использовать для получения суммарной характеристики их сродства к внутриэритроцитарным восстановителям. Такие исследования должны проводиться при контролируемом содержании кислорода, поскольку выше было показано, что изменение pO_2 может существенно влиять на скорость восстановления феррицианида калия в силу конкурентных отношений между потоками восстановительных эквивалентов, переносимых на кислород и на внешнюю редокс-систему. Это обуславливает необходимость параллельного измерения pO_2 в кювете для потенциометрических измерений. Сравнение данных, получаемых при различном содержании кислорода, в свою очередь, может быть использовано для характеристики сродства к кислороду восстановленной формы электронакцепторного соединения.

Изменение скорости восстановления феррицианида калия эритроцитами человека при внесении химических соединений можно использовать для оценки степени «окислительной нагрузки» на ГМФС эритроцитов, которую может создать конкретное соединение при попадании в организм человека. Такая информация имеет большое практическое значение при лекарственных назначениях лицам с наследственными дефектами системы ГМФС эритроцитов, у которых химические соединения, окисляющие восстановители, связанные с ГМФС, приводят к значительному укорочению времени жизни эритроцитов в кровяном русле.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ КЛЕТОЧНО-ТКАНЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Использование клеточно-органных препаратов в качестве модельной системы, сохраняющей ряд метаболических и функциональных свойств, сближающих их с тканью *in vivo*, может быть успешным лишь при соблюдении некоторых условий, связанных с их приготовлением, подбором режима инкубации, периодом исследования и т. д. Эти же условия необходимы для получения воспроизводимых результатов.

Техника приготовления срезов была разработана в свое время Мак Илвейном [394]. Несмотря на то что она была предложена применительно к нервной ткани, микротом Мак Илвейна используется и при работе с другими тканями. Удачная модификация этого микротомы, обеспечивающая меньшую травматизацию кусочков, предложена Н. А. Емельяновым [20]. Существуют и другие более простые способы получения сравнительно одинаковых по толщине срезов, например два параллельно склеенных лезвия бритвы с расстоянием между ними в 0,2–0,3 мм [60].

Степень измельчения ткани влияет на ее метаболическую реактивность. При этом меняются скорость потребления кислорода на единицу веса и стабильность дыхания препарата во времени. Особенно чувствительны к тканевой дезинтеграции синтетические реакции. Так, например, при дезинтеграции печени уменьшаются синтез мочевины и окисление жирных кислот. При гомогенизации мозга подавляется синтез ацетилхолина. Синтез фосфата мозговыми срезами, который зависит от энергетических процессов, значительно уменьшается при гомогенизации.

Изменение метаболизма может быть связано с нарушением энзиматической активности, наступающим вслед за неизбежным лизисом клеток при препаровке. Некоторые энзиматические изменения более выражены и усилены благодаря разрушению клеточных мембран, представляющих барьер для проникновения целого ряда веществ. В то же время торможение дыхания, особенно в клеточных суспензиях, может происходить при: высвобождении из клетки и соответствующем разведении коэнзимов или кофакторов, которые в определенной концентрации имеются в норме; вымывании и разведении АТФазы и других гидролитических ферментов, локализованных в интактной клетке; прямом разрушении различных внутриклеточных

структур. При этом потеря активности в гомогенате не всегда обозначает падение активности во фракциях гомогената, и наоборот. Так, митохондрии могут обладать активностью, которая отсутствует в гомогенате, содержащем митохондрии. При этом подразумевается влияние энзимов, имеющих в гомогенатах, которые оказывают действие на поведение митохондрий и стабильность кофакторов, необходимых для оптимальной активности. Как показано в гл. 2 и 3, нормальное течение окислительно-восстановительных превращений часто требует взаимодействия различных клеточных систем, например митохондриальной и микросомальной. Таким образом, полноценная дыхательная активность и интактность клеточной структуры тесно связаны друг с другом.

Срезы, толщина которых составляет менее 0,2 мм, отличаются нестабильностью дыхания. Заметное и достоверное снижение скорости потребления кислорода (до 50% от максимального) имеет место на срезах толщиной 0,07 мм и менее, а также на срезах, превышающих 0,5 мм. Достоверных отличий изменения степени восстановленности дыхательных переносчиков от толщины среза обнаружено не было. Отсутствовала корреляция между этими двумя параметрами и при окислении экзогенного сукцината, хотя наблюдалась сильная стимуляция дыхания. Таким образом, предполагается, что колебания pO_2 внутри срезов различных тканей, зависящие от толщины срезов и скорости дыхания, не столь существенны и не отражаются значимым образом на свойствах ткани.

Оксигенация инкубируемой среды. Интактные животные (млекопитающие), как известно, требуют сравнительно высоких парциальных давлений кислорода, для того чтобы дыхание могло происходить с нормальной скоростью. Для изолированных клеток и митохондрий критическое pO_2 , как уже говорилось, не превышает нескольких миллиметров рт. ст. При оксигенации препаратов чистым кислородом или карбогеном (95% O_2 +5% CO_2) парциальное давление кислорода в срезе значительно превышает то, которое имеет место для ткани в физиологических условиях. Токсическое действие кислорода на организм давно известно. В настоящее время порог токсической дозы для целого организма определяется в 35–45 мм рт. ст. В условиях *in vivo* его эффект, однако, считается обратимым. Значительно более выражено токсическое действие O_2 в условиях *in vitro*. Чувствительность тканей к кислородному от-

равлению увеличивается по мере их измельчения. Она зависит также от типа ткани: мышца < легкое < почка < тестисы < печень < спинной мозг < головной мозг.

Уже в 1942 г. Эллиот отметил, что, хотя срезы толщиной 0,5 мм имели начальную скорость дыхания в воздухе несколько более низкую, чем в чистом кислороде, она оставалась в первом случае более стабильной и через 2 ч превышала скорость дыхания срезов в кислороде. Автором был сделан вывод о том, что для исследования дыхательной и метаболической активности срезов лучше использовать воздух, а не чистый кислород. Диффузия кислорода из воздуха в срез, по его мнению, адекватна для поддержания максимальной скорости дыхания. К аналогичным выводам пришли и другие исследователи. Механизм токсического действия связывается в настоящее время с образованием и накоплением перекиси в клетке. Эффект усиливается в гомогенатах по сравнению со срезами. «Кислородное отравление» проявляется уже через 20 мин и вначале обратимо. Лишь через 3 ч наступают признаки необратимых метаболических нарушений.

Температурный режим. Большинство полярографических измерений на изолированных митохондриях первоначально проводилось при температуре 22–26°. Эти условия не могут быть признаны подходящими при работе с тканевыми препаратами по нескольким причинам. Главная из них заключается в конечной цели подобного рода экспериментов: получении модели, максимально сохраняющей функциональные свойства ткани данного типа. Однако снижение температуры ниже 32–30° резко их нарушает. У возбудимых тканей млекопитающих исчезает способность реагировать на электрическую стимуляцию. Подавляются синтетические процессы. Снижается активность многих ферментных процессов. В целом функционально-метаболическая картина начинает резко отличаться от условий *in vivo*.

Переход к физиологической температуре инкубации увеличивает интенсивность окисления субстратов, ускоряет их утилизацию (более быстрое возвращение к исходному дыханию при 37°) и может вообще менять соотношение, направленность и эффективность действия субстратов [49, 59]. Изменение температуры влияет на чувствительность к ингибиторам и разобщителям. Амита-чувствительное дыхание для некоторых субстратов (α -кетоглутарат, НАДН) увеличивается при переходе к

более высоким температурам; для других (см. табл. 9) уменьшается [49, 59]. Разнонаправленный эффект может иметь место при разных температурах и в случае других ингибиторов.

Применяемая многими исследователями предварительная инкубация ткани при снижении температуры до 20–25° задерживает ликвидацию последствий экстирпации и восстановление энергетической регуляции (см. табл. 9). Наконец, при уменьшении температуры до 30°C подавляются реакции микросомального окисления.

Переход от низкой температуры в период преинкубации к более высокой во время полярографического опыта по измерению дыхания также нежелателен, так как, в свою очередь, приводит к изменению стационарного режима, в котором работала клетка, и влияет на дыхание. Известны данные об отрицательном влиянии температурного режима на баланс ионов в клетке [204].

Тщательное сопоставление суммы метаболических реакций, реализующихся при 20° и 37°, и их влияния на функциональные параметры клетки дает основание для заключения о том, что при работе с тканевыми и клеточными препаратами, используемыми в качестве функциональной модели, следует применять температуры, близкие к физиологическим.

Среда инкубации имеет принципиальное значение для сохранения метаболических свойств срезов. Существует очень большое количество прописей различных сред. Однако очевидно, что солевой состав должен быть близок к составу плазмы крови. Необходимыми компонентами являются субстраты, в том числе глюкоза. Инкубация в бессубстратной среде приводит к резкому нарушению электролитного состава в клетках и их набуханию. Наличие глутамата регулирует, по-видимому, содержание K^+ в клетке. Сукцинат обеспечивает поддержание более высокого и стабильного уровня дыхания даже по сравнению с глюкозой. Однако одного только сукцината недостаточно для поддержания метаболического и функционального статуса клетки. Наиболее употребимыми средами для инкубации срезов являются среда Krebs–Рингера, Мак Илвейна, Тирод, Krebs – Хенселяйте. В суспензию изолированных клеток желательно добавление альбумина.

Для получения полноценных срезов процедура декаптации должна быть сокращена минимально (1–2 с), а экстирпация ткани завершена в течение 2–3 мин (не

более 5 мин вместе с изготовлением срезов). Сразу же после этого срезы помещаются в специальные боксы или чашки Петри и заливаются подогретой до нужной температуры инкубационной средой так, чтобы слой жидкости покрывал их не более чем на 2—3 мм (для облегчения диффузии кислорода к срезу). Желательно периодическое перемешивание инкубационного раствора. Инкубация ведется в термостате, отрегулированном на 35—37°.

«Возраст» тканевых препаратов. Выше рассматривалось, что метаболические и функциональные свойства клеточных и тканевых препаратов меняются в процессе переживания.

Экстирпация ткани вызывает глубокие повреждения, вызванные: частичной деструкцией клеток на пограничных поверхностях; перерезкой нервных путей и нарушением проводимости кровообращения, а следовательно, доставкой питательных веществ в клетку и возникновением ишемического состояния и т. д. Однако, если создать благоприятные условия для инкубации (температурный режим, питательная среда, газирование и т. д.), в тканевых препаратах (срезах) происходит относительное восстановление свойств, присущих ей *in vivo*. Они могут поддерживаться некоторое время, после чего (в отличие от культуры) процессы катаболизма начинают превалировать над процессами анаболизма. Происходят «старение» препарата и утрата органотипических свойств.

Описываемые изменения происходят в следующей временной последовательности. Сразу же после экстирпации и в ближайшие 5—10 мин наблюдаются интенсивный распад АТФ и креатинфосфата, накопление АДФ, неорганического фосфата, увеличение отношения лактат/пируват [394]. Нарушается энергозависимый процесс потребления аминокислот, происходит нарушение ионного градиента [204]; в срезах мозга не регистрируется потенциал покоя и электростимуляция не вызывает увеличения скорости потребления кислорода [43, 50]. Способность к сокращению нарушается в изолированных полосках мышц и миокарда и пр. В это же время отмечается резкая интенсификация дыхания, а также чрезвычайно интенсивное восстановление внутриклеточного пула НАД(Ф)Н.

Однако энергетическая декомпенсация начинает восстанавливаться уже через 10—15 мин и в последующие 30—40 мин происходят увеличение уровня макроэргических фосфатов практически до исходного, снижение уров-

ня АДФ, неорганического фосфата. Скорость дыхания независимо от субстрата окисления резко снижается при параллельном уменьшении интенсивности люминесценции НАД(Ф)Н (на 40—50% за первые 10—14 мин после экстирпации). Метаболическая реактивность срезов остается сниженной на протяжении всего этого периода, названного нами в свое время постгипоксической активацией [29, 43—45]. Тем не менее эти явления не связаны с нарушением работы дыхательной цепи. Об активном восстановлении энергетического потенциала клетки в этот период свидетельствуют данные Мак Илвейна и сотрудников [393, 394]. Интенсивная люминесценция НАД(Ф)Н, наблюдаемая у свежеизолированных тканевых препаратов, имеет, видимо, преимущественно цитоплазматическое происхождение. Учитывая ее быстрое снижение в первые 30 мин после экстирпации ткани при поддержании активной работы дыхательной цепи, можно предполагать, что один из возможных путей освобождения клетки от восстановленных эквивалентов — использование цитоплазматического НАД(Ф)Н в качестве субстрата окисления.

Таким образом, физиологический смысл периода «постгипоксической активации» состоит во включении компенсаторных метаболических реакций, способных нормализовать энергетическую регуляцию и перевести ее в новый стационарный режим, обеспечивающий поддержание функции тканей, нарушенной экстирпацией. Поэтому при работе со срезами экспериментатору следует обеспечить оптимальные условия инкубации для «прохождения» через этот период.

Относительное восстановление многих метаболических и функциональных параметров в изолированной ткани можно наблюдать через 30—50 мин после экстирпации (вначале печень, затем миокард и, наконец, мозг). Начиная с этого времени регистрируются активное потребление аминокислот, активный синтез РНК, включение аминокислот в белки, восстанавливается и поддерживается стационарный уровень ионных градиентов, появляется потенциал покоя, удается зарегистрировать вызванную электрическую активность. Электростимуляция и аноксия приводят к деполяризации, исчезновению потенциала покоя, перераспределению ионов, выходу медиаторов из срезов мозга, увеличению образования цАМФ и пр.

Дыхание, однако, стабилизируется на некотором, значительно более низком уровне, нежели у свежеизолирован-

ных срезов. Спектры люминесценции НАД(Ф)Н и флавопротенидов свидетельствуют об увеличении специфического НАД-зависимого окисления. Усиливается эффект, сходный с обратным переносом электронов при окислении сукцината. Электростимуляция активирует дыхание [50, 394]. Срезы мозга активно потребляют из инкубационной среды меченые медиаторы возбуждения и тормозного действия при сохранении специфичности, известной для различных отделов центральной нервной системы и т. д. Следовательно, это свидетельствует о восстановлении синаптических контактов между нейронами.

Период относительного восстановления метаболических и функциональных свойств срезов тканей продолжается 1,5–2 ч (в зависимости от режима инкубации и типа ткани), после чего начинают превалировать катаболические процессы, связанные со старением препарата, подробно описанные нами ранее [43, 49], приводящие к постепенной потере специфических метаболических и функциональных свойств препаратов.

КЛЕТОЧНО-ТКАНЕВЫЕ МОДЕЛИ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПРИ ПОИСКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СКРИНИНГА

Выше неоднократно отмечалось, что клетки и тканевые препараты (срезы, перфузируемые органы) сохраняют многие свойства, присущие intactной ткани в условиях *in vivo*. Это касается и кислородзависимых процессов, которые самым прямым образом включаются в реализацию специфической функции клетки. Именно поэтому дыхание давно уже используется в медицине в качестве объемного и чувствительного метаболического показателя функционального состояния организма. Хорошо известны более или менее успешные попытки многих исследователей изучать действие фармакологических веществ на дыхание изолированных препаратов: гомогенатов, клеточных суспензий, срезов. Возможным объектом для анализа физиологического состояния являются изолированные митохондрии, применение которых с этими целями подробно изложено во многих статьях и сравнительно недавно обобщено в специальном монографическом сборнике [35].

Сохраняя за митохондриями все привилегии, связанные с изучением работы дыхательной цепи, следует тем не

менее помнить, что далеко не всегда изолированные субклеточные органеллы могут быть использованы для выяснения направленности действия и места приложения вещества в клетке.

Это связано прежде всего с тем, что работа изолированного митохондриального аппарата, по-видимому, не аналогична его работе в клетке. Хорошо известен факт, что чрезвычайно интенсивное накопление кальция и фосфата изолированными митохондриями не идет ни в какое сравнение с таковыми *in vivo*. Можно представить себе, что, освободившись из-под контролирующих и сдерживающих механизмов, существующих в intactной клетке, митохондрии как бы «дичают», выражением чего и служит столь интенсивное связывание ими кальция *in vitro* [42]. Примеры, подтверждающие отсутствие идентичности различных функциональных параметров у митохондрий сравнительно с клеточными системами *in vivo in vitro*, имеются и у других исследователей [50, 59, 68].

Появление таких высокочувствительных и высокоинформативных методов, как полярография, спектрофотометрия и флуоресцентная регистрация степени восстановления дыхательных переносчиков, многократно усиливает эти преимущества и позволяет, как было показано выше, оценивать соотношение различных метаболических пулов, связанных с работой различных окислительных систем.

Нам представляется возможным использовать клеточно-тканевые препараты в качестве биологической модели для выявления веществ с направленным действием на те или иные кислородзависимые процессы.

Выявление ингибиторов НАД-зависимого участка дыхательной цепи

Специфические ингибиторы НАД-зависимого участка дыхательной цепи амитал и ротенон широко используются исследователями для оценки вклада в общее дыхание субстратов, окисляющихся через этот участок, и интенсивности потока электронов не только на изолированных митохондриях, но и на тканях и клетках.

В настоящее время установлено, что самые разнообразные химические соединения, обладающие высокой липидорастворимостью, могут взаимодействовать с начальным участком дыхательной цепи между НАД⁺ и цитохромом b [79]. Эффект обусловлен неспецифической гидрофобной

адсорбцией полярных и нейтральных молекул на ферменте, приводящей к торможению транспорта электронов. В полиферментной системе митохондрий он показан, в частности, для нейтральных ароматических соединений, слабых кислотных фенолов, а также производных барбитуровой кислоты. Все эти вещества объединяются общими признаками: высокими pK и липидорастворимостью. Эти свойства в целом определяют направленность их действия в изолированных полиферментных системах как ингибиторов дыхания и фосфорилирования при окислении НАД-зависимых субстратов, когда активирован первый участок дыхательной цепи, на котором указанные вещества легко адсорбируются. Эти же вещества слабее адсорбируются на втором гидрофобном участке дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа—цитохром b). Поэтому их влияние на окисление сукцината проявляется при концентрациях, значительно более высоких, чем при окислении НАД-зависимых субстратов.

Методы исследования химико-физического взаимодействия веществ с первым ферментным комплексом дыхательной цепи в изолированной полиферментной системе митохондрий в настоящее время достаточно хорошо разработаны [79]. При этом наряду с сопоставлением ингибирующего влияния исследуемого вещества на скорость окисления НАД-зависимых субстратов и сукцината, измеряемого по изменению скорости потребления кислорода, исследуют редокс-состояния дыхательных переносчиков оптическими методами. Ограничение транспорта электронов в ферментном комплексе I, как известно, приводит к увеличению восстановленности митохондриального НАД и окислению цитохромов дыхательной цепи («амитал»- или «ротенонподобное» действие). Ингибирующий НАД-зависимое дыхание эффект снимается производными убихинона, и в частности менадиона (K_3), который, встраиваясь в дыхательную цепь, при наличии фермента диафоразы создает шунт на участке НАД—цитохром b и частично восстанавливает тем самым прерванный ингибитором транспорт электронов. Это, в свою очередь, приводит к некоторому восстановлению дыхания и уменьшению отношения НАДН/НАД.

Проверка возможности выявления неспецифического взаимодействия химических соединений с НАД-зависимым участком дыхательной цепи производных барбитуровой кислоты (барбамил, барбитал, барбитал натрия, фенобар-

битал, этаминал натрия) была проведена на клеточно-тканевых препаратах (срезы печени, миокарда, мозга).

Все исследованные вещества угнетали тканевое дыхание, причем эффект зависел от концентрации вещества, субстрата окисления и типа ткани. При окислении НАД-зависимых субстратов ингибирующее действие барбитуратов было выражено наиболее сильно. Концентрация веществ, равная 10^{-3} М, подавляла дыхание срезов мозга на 59%, миокарда — на 41 и печени — на 33%. При этом 20%-ное ингибирование дыхания (I_{20}) можно было наблюдать уже при концентрациях 10^{-9} — 10^{-5} М 30%-ное (I_{30}) — при концентрациях 10^{-7} — 10^{-4} М; 50%-ное ингибирование дыхания (I_{50}) для мозга в интервале исследованных концентраций достигалось не всегда. Так, на фоне барбамила и фенобарбитала I_{30} не достигалось. На срезах миокарда действие барбитуратов, ингибирующее дыхание, проявлялось слабее, чем на срезах мозга, и I_{50} не было получено ни в одном случае. На срезах печени не только I_{50} , но и I_{30} и даже I_{20} не были зарегистрированы при действии, например, барбамила и этаминала натрия.

Таким образом, подавление дыхания барбитуратами при окислении смеси глутамата и малата было более выражено на срезах мозга сравнительно с другими тканями.

В отличие от описанного выше барбитураты слабо влияли на окисление сукцината. В подавляющем числе случаев максимальная концентрация исследованных веществ (10^{-3} М) снижала дыхание не более чем на 20%. Скорость потребления кислорода при этом уменьшалась в мозге не более чем на 12%, в миокарде — на 16%, в печени не менялась либо даже усиливалась (рис. 50).

Таким образом, на срезах, так же как и на изолированных митохондриях, проявляется известное для производных барбитуровой кислоты свойство избирательного подавления окисления НАД-зависимых субстратов сравнительно с окислением сукцината.

Подтверждением того, что действие барбитуратов связано именно с НАД-зависимым участком дыхательной цепи, является происходящее на их фоне сопряженное с торможением дыхания увеличение степени восстановленности НАД (Ф)Н и флавопротеидов, обусловленное ограничением переноса электронов в дыхательной цепи от окисляемого НАД-зависимого субстрата (см. рис. 24). По мере нарастания концентрации барбамила, добавляемого в реакционную среду к срезам, так же как и любого другого производного

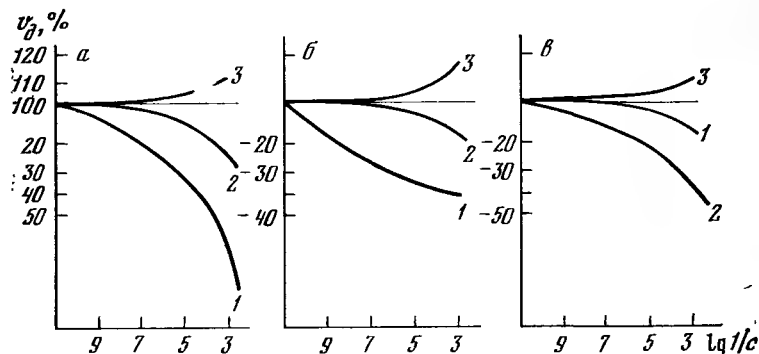


Рис. 50. Изменение дыхания от нарастающих концентраций амита-ла в срезах мозга (а), печени (б) и сердца (в)

1 — пируват; 2 — глюкоза; 3 — сукцинат

барбитуровой кислоты, степень восстановленности НАД(Ф)Н и флавопротеидов увеличивается. Эти результаты свидетельствуют о том, что: во-первых, наблюдаемые изменения действительно связаны с дыхательной цепью (люминесцирующий пул флавопротеидов в целых клетках, как известно, на 90% связан с флавином НАД-зависимого участка дыхательной цепи митохондрий); во-вторых, местом приложения барбитуратов в дыхательной цепи митохондрий нервных клеток является участок между флавопротеидом и КоQ.

K₂, добавленный в условиях окисления НАД-зависимых субстратов, слабо влияя на дыхание, снижал степень восстановленности НАД(Ф)Н и особенно флавопротеидов (см. рис. 19). Таким образом, в клеточной системе он так же, как и в изолированных митохондриях, может, по-видимому, шунтировать поток электронов на участке НАД—КоQ и тем самым снижать эффект гидрофобных ингибиторов.

При сравнении влияния различных барбитуратов на изменение степени восстановленности НАД(Ф)Н выявляются некоторые количественные различия, коррелирующие с химической структурой веществ. Так, интенсивность восстанавливающего эффекта нарастает до определенных пределов с увеличением алкильного радикала (так же как при этом нарастает в условиях *in vivo* сила действия барбитуратов). Поэтому максимальная степень восстановленности НАД(Ф)Н при использовании одной и той же дозы иссле-

дуемых веществ была получена для этаминала натрия. Барбитал натрия обладал уже значительно меньшей восстанавливающей эффективностью. Наименьшие изменения были отмечены для бензонала, имеющего циклический радикал вместо алкильного.

Для сравнения исследована кривая зависимость дыхания от концентрации фенотиазина — вещества, которое, как известно, угнетает активность сукцинатдегидрогеназы. Из рис. 51 действительно видно преимущественное ингибирующее его действие на окисление сукцината сравнительно с НАД-зависимыми субстратами.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что на тканевых срезах, так же как и на митохондриях, можно выявлять избирательное действие ингибиторов НАД-зависимого участка дыхательной цепи, которое наиболее легко демонстрируется на срезах мозга.

Идентификация модификаторов интенсивности метаболизма ксенобиотиков по параметрам кислородзависимых реакций

Показателями вклада кислорода, участвующего в митохондриальных и немитохондриальных окислительных процессах, от общего валового его потребления являются цианидчувствительная и цианидрезистентная (нечувствительная) компоненты дыхания. Как уже указывалось, эти величины чрезвычайно лабильны. Так, при окислении различных субстратов дыхательной цепи соотношение цианидчувствительного и цианидрезистентного дыхания меняется. Индукция ферментов системы микросомального окисления (хроническое введение фенobarбитала) и присутствие субстрата микросомального окисления амидопирин приводят к увеличению цианидрезистентного дыхания. Подавление активности системы микросомального окисления (хроническое введение CdCl₂) уменьшает его и т. д.

Для отбора модификаторов и субстратов микросомального окисления был разработан критерий, позволяющий производить оценку относительной интенсивности метаболизма ксенобиотиков и степени зависимости микросомального окисления от активности дыхательной цепи. Она определяется по степени стимуляции дыхания срезов субстратами микросомального окисления на фоне действия ингибиторов цитохромоксидазы (рис. 51).

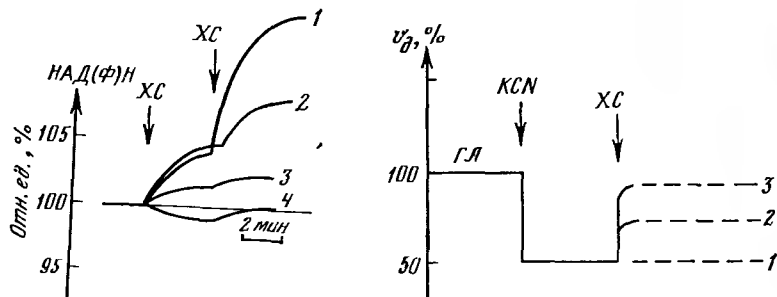


Рис. 51. Изменение степени восстановленности в присутствии различных ингибиторов НАД-зависимого окисления

ХС — добавка испытуемого вещества; 1 — нембутал; 2 — амитал; 3 — фенобарбитал; 4 — аминазин

Рис. 52. Схема испытаний веществ, взаимодействующих с ферментами митохондриального окисления, на фоне цианидного блока

1 — на фоне ингибирования активности системы митохондриального окисления (голодание, предварительная инъекция CdCl_2 , адреналин); 2 — контрольные животные; 3 — на фоне индуцированной системы митохондриального окисления (предварительное введение фенобарбитала)

Система испытаний апробирована на примере широко используемого лекарственного средства — амидопирина (типичный субстрат митохондриального окисления) на тканевых препаратах печени в различных функциональных состояниях: а) после индукции ферментов системы митохондриального окисления предварительными инъекциями фенобарбитала *in vivo*; б) на фоне гликогенолиза (сытые) и гликогеногеноза (голодные животные); в) после хронического введения CdCl_2 ; г) при окислении специфического субстрата дыхательной цепи сукцината.

При блокировании дыхательной цепи цианидом становится особенно отчетливой стимуляция потребления кислорода срезами печени сытых животных. У голодных животных она отсутствует или выражена слабо. После хронического введения фенобарбитала этот эффект выражен более сильно, как уже указывалось в гл. 3. Стимуляция скорости потребления кислорода связана с активацией кислородзависимой реакции окисления ксенобиотика.

Действие амидопирина на дыхание срезов печени сытых животных, которым вводили CdCl_2 , выражено слабо даже на фоне цианида.

Преинкубация срезов печени сытых животных с адреналином (активация гликогенолиза *in vitro*) приводит к появлению такой же дыхательной реакции, как и у голодных животных, или к резкому уменьшению стимулирующего действия на дыхание субстрата митохондриального окисления на фоне цианида (рис. 52).

Преинкубация срезов печени сытых животных с сукцинатом приводит к интенсификации окисления амидопирина, так как сукцинат за счет обратного переноса электронов поставляет восстановительные эквиваленты в систему митохондриального окисления. При использовании других субстратов дыхательной цепи стимулированное амидопирином дыхание было значительно меньше.

На основании полученных результатов можно составить алгоритм для оценки интенсивности метаболизирования исследуемого химического соединения в печени. Из рис. 52 видно, что различные ксенобиотики — субстраты митохондриального окисления — стимулируют потребление кислорода на фоне цианидного блока дыхательной цепи. Эффект маскируется либо выражен значительно меньше, если действие веществ было реализовано в условиях сохранения активности дыхательной цепи. Такой тип ответов может быть получен, если в цитозоле с высокой скоростью происходит регенерация НАДФН (активный гликогенолиз, преинкубация срезов с сукцинатом, индукция ферментов митохондриального окисления) (см. рис. 52). В условиях недостаточности НАДФН в цитозоле (голодание) либо нарушения активности системы митохондриального окисления (CdCl_2) субстраты этой системы не оказывают действия на потребление кислорода тканью или даже ингибируют его.

Таким образом, система испытаний веществ на тканевых моделях может быть использована и для выявления нарушения в митохондриально-митохондриальных отношениях.

Оценка действия химических соединений на транспорт K^+ в тканевых препаратах

Как уже указывалось, в нейрональных мембранах при создании концентрационных градиентов и генерации мембранного потенциала особое функциональное значение имеет транспорт Na^+ и K^+ . Энзиматической основой переноса этих ионов служит $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФаза}$ [49, 607]. Сопровождающая активацию $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазы}$ утилизация

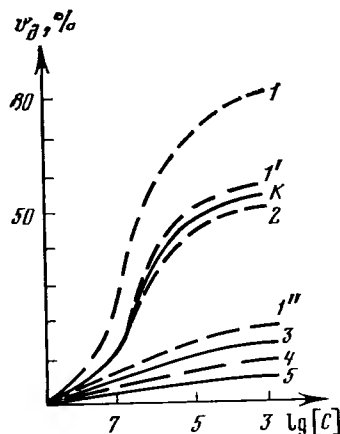


Рис. 53. Действие ингибиторов и активаторов $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы на дыхание срезов мозга

- 1 — низкие концентрации ацетилхолина (10^{-7} М);
 K — контроль;
 1' — ацетилхолин (10^{-5} М);
 1'' — ацетилхолин (10^{-3} М);
 2 — тубазид;
 3 — кофеин;
 4 — амизил;
 5 — строфантин

O_2 в нервной ткани составляет 30–40% от валового потребления кислорода клеткой [607]. Это свойство было использовано для разработки теста, позволяющего выявить действие химических соединений на транспорт K^+ в целых клетках.

Показано, что при действии экзогенного калия (10^{-2} – $3 \cdot 10^{-1}$ М) на срезы коры головного мозга, преинкубируемые 60 мин при температуре 36°C в среде, содержащей 10 мМ глюкозы, регистрируется двухфазное изменение скорости их дыхания (стимуляция с последующим ингибированием). Оно сопровождается соответствующими двухфазными редокс-превращениями НАД(Ф)Н и флавопротеидов [первичным окислением, сменяющимся восстановлением (см. рис. 16)]. Ингибиторы дыхания (KCN, амитал), разобщитель окислительного фосфорилирования динитрофенол и ионы кальция подавляли активируемую K^+ -компоненту дыхания (рис. 53) и истощали эндогенные запасы K^+ . Измерения, выполненные на пламенном фотометре, показали, что KCN уменьшал содержание эндогенного калия в 1,5–2,5 раза, а динитрофенол — в 3 раза.

Это согласуется с тем фактом, что активный транспорт является энергозависимым процессом и нарушения окислительного метаболизма ведут к ингибированию транспорта катионов.

Модель была апробирована на ряде фармакологических препаратов с известным действием на транспортную АТФазу. Строфантин — специфический ингибитор $\text{Na}^+ -$

K^+ -АТФазы — подавлял активируемую K^+ -компоненту дыхания (см. рис. 53) и снижал эндогенные запасы калия в 2 раза. Идентичный эффект был получен при исследовании веществ, специфически действующих на центральную нервную систему (амизил, кофеин, этаперазин) (см. рис. 52) и известных своим ингибирующим действием на транспортную АТФазу [166]. Известно, что различные концентрации ацетилхолина также меняют активность $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазы: низкие стимулируют, а высокие ингибируют ее [169]. Действительно, из рис. 52 следует, что ацетилхолин в концентрации 10^{-7} М не менял активируемую K^+ -компоненту дыхания; в концентрации 10^{-5} М стимулировал ее; а в концентрации 10^{-3} М ингибировал транспорт калия в клетки. Тубазид — соединение, индифферентное по отношению к $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазе, не влиял на активируемую K^+ -компоненту дыхания.

Таким образом, калиевая нагрузка может быть использована для первичного отбора веществ — ингибиторов и стимуляторов $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -транспортной АТФазы в срезах мозга.

Макрофаги в качестве биологической модели для исследования процессов биологического окисления

Получение изолированных интактных клеток является актуальным вопросом для целого ряда направлений прикладной биохимии и биофизики, связанных с необходимостью проведения исследований на биологических моделях, сохраняющих функциональную активность. Значительные преимущества для использования в качестве клеточных модельных систем имеют «свободноживущие» клетки организма, такие, как эритроциты, лейкоциты и др. Это связано с тем, что процедура их выделения значительно мягче, чем при получении клеток из органов путем диспергирования последних, что обеспечивает сохранение ими основных функциональных свойств.

В нашей лаборатории Л. В. Мерцаловой был разработан способ получения обогащенной (90–95%) популяции моноядерных лейкоцитов — перитонеальных макрофагов, прикрепленных к стеклу в виде монослоя. Известно, что макрофаги широко представлены в различных органах и тканях организма (альвеолярные и перитонеальные макрофаги, купферовские клетки печени и др.) и являются особым типом фагоцитирующих клеток — «чистиль-

щиков» ретикулоэндотелиальной системы. В последние годы они привлекли внимание широкого круга исследователей, так как появились данные об их антимикробной и антиканцерогенной активности, участии в иммунных ответах, а также об их особой роли в воспалительных процессах.

Большое значение во всех этих эффектах придается плазматической мембране макрофагов, включающейся в инициацию и контроль клеточной активности. Конформационные изменения, происходящие в ней при контакте с внешним раздражителем, являются триггером цитоплазматических изменений и активируют ключевые ферменты, в том числе связанные с процессами биологического окисления. При соприкосновении с любыми агентами, нарушающими молекулярную структуру или организацию мембраны, макрофаги, так же как и полиморфноядерные лейкоциты — нейтрофилы, отвечают так называемой дыхательной вспышкой (см. гл. 4). Их энергетические потребности реализуются за счет активности дыхательной цепи и гликолиза. Наконец, макрофаги, видимо, способны метаболизировать чужеродные соединения за счет немитохондриальных процессов (см. гл. 3). Благодаря всему этому макрофаги являются удобной клеточной моделью для решения целого ряда вопросов, как связанных с проблемой клинической биохимии, так и касающихся молекулярных аспектов и регуляции внутриклеточных процессов.

Получаемые нами перитонеальные макрофаги, прикрепленные к стеклу (рН 7,4; 37°С), содержали лишь незначительную (5—10%) примесь других клеток (эозинофилов, нейтрофилов, лимфоцитов). Макрофаги сохраняли способность фагоцитировать частицы латекса. Окисляя специфический для них субстрат — глюкозу, они потребляли кислород со скоростью 0,2—0,3 нмоля/мин·10⁶ клеток.

Согласно цитохимическим данным, полученным Л. В. Мерцаловой, макрофаги обладают высокой активностью сукцинатдегидрогеназы. Стимуляция дыхания экзогенным сукцинатом (10 мМ) достигает в среднем 36%. Это дыхание практически полностью нечувствительно к амиталу, что отличает окисление сукцината от НАД-зависимых субстратов, когда амиталчувствительное дыхание может составлять 30—70%. При окислении сукцината происходит восстановление пиридиннуклеотидов, которое отсутствует, если НАД-зависимый участок дыхательной

цепи ингибирован амиталом или ротеноном. Следует предположить, что окисление сукцината в исследованных клетках может быть сопряжено с обратным транспортом электронов в дыхательной цепи.

Несмотря на низкую активность глутаматдегидрогеназы, показанную Л. В. Мерцаловой для перитонеальных макрофагов, глутамат совместно с малатом (1:1, 10 мМ) также стимулирует дыхание, что предполагает возможность преимущественного окисления в этом случае малата. Амиталчувствительное дыхание достигает при этом 35—40%.

При окислении сукцината и глутамата+малата цианид (3×10^{-3} М) ингибирует дыхание на 60—80% и восстанавливает пиридиннуклеотиды. Таким образом, у макрофагов активны как сукцинатоксидазный, так и НАД-зависимый путь. При окислении глюкозы используется НАД-зависимый путь поступления восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь, так как амиталчувствительное дыхание в этом случае составляет около 70%.

Цианид в низких концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ М) подавляет дыхание перитонеальных макрофагов, связанное с окислением глюкозы, на 50%. Однако с увеличением концентрации ингибитора цитохромоксидазы его действие на дыхание уменьшается, а при концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ М эффект может даже обращаться (стимуляция дыхания от KCN). Так как KCN является одновременно ингибитором каталазы, можно предполагать, что наблюдаемый эффект связан с подавлением им разложения H₂O₂ и образования кислорода. Но тогда следует, что при окислении макрофагами глюкозы идет спонтанное образование перекиси водорода с последующим выделением кислорода, который маскирует процесс его утилизации, связанный с функцией дыхательной цепи. Действительно, добавление высоких концентраций каталазы (0,1 мг/10⁶ клеток) на фоне стимуляции дыхания от KCN не только тормозит дыхание, но и нередко приводит к увеличению концентрации кислорода в среде, которое тем больше, чем выше концентрация ингибитора.

В гл. 4 было рассмотрено формирование «дыхательной вспышки» у фагоцитирующих клеток, в том числе у макрофагов, связанной с активацией мембранной НАДФН-оксидазы, не чувствительной к ингибиторам дыхательной цепи. Нами совместно с Л. В. Мерцаловой было показано,

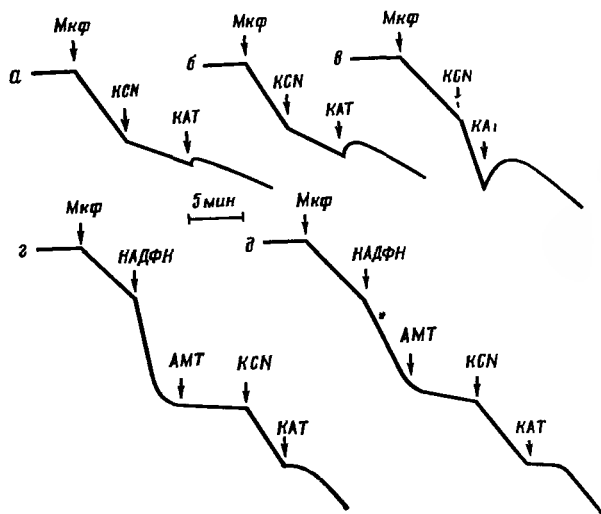


Рис. 54. Полярографическая запись (закрытая полярографическая ячейка) дыхания макрофагов (мкф) ($t=36,5^{\circ}\text{C}$)

а—в, г — pH 7,4; г — pH 5,5; KCN: а — $5 \cdot 10^{-4}$ М; б — 10^{-3} М; в — $3 \cdot 10^{-3}$ М; НАДФН 10^{-3} М; амитал (амт) 10^{-3} М, каталаза (кат) 0,1 мг/10⁶ клеток

что субстрат НАДФН-оксидазы НАДФН (1 мМ) без латентного периода стимулировал дыхание перитонеальных макрофагов в среднем на 25% (pH 7,4) и вызывал резкое окисление пиридиннуклеотидов и флавинов (рис. 54). Через несколько минут, однако, наступала частичная нормализация дыхания либо даже могло иметь место небольшое его торможение сравнительно с исходным. Часть стимулированного дыхания (до 33%) была чувствительна к амиталу. «Дыхательная вспышка» усиливалась (в 3,3 раза) при pH 5,5, т. е. в условиях, оптимальных для активации НАДФН-оксидазы. Но и в этом случае часть дыхания (до 47%) оставалась чувствительной к амиталу. KCN (1 мМ), добавленный после НАДФН, стимулировал дыхание, причем гораздо сильнее, чем в случае окисления глюкозы. Каталаза обращала этот эффект. Стимуляция дыхания макрофагов в присутствии экзогенного НАДФН сохранялась, если амитал и KCN добавлялись до внесения субстрата. Более того, она существенно усиливалась.

Таким образом, окисление НАДФН перитонеальными макрофагами возможно в условиях блока дыхательной цепи и сопряжено с образованием H_2O_2 . В том же слу-

чае, когда дыхательная цепь функционирует, некоторая часть экзогенного НАДФН может, видимо, окисляться в дыхательной цепи по амиталчувствительному пути.

Все эти эксперименты демонстрируют, что макрофаги могут быть с успехом использованы для прижизненного исследования особенностей работы дыхательной цепи в этих клетках и активности других кислородзависимых реакций, а также при выявлении биологически активных соединений, действие которых направлено на то или иное звено этих процессов (например, ингибиторов или активаторов НАДФН-оксидазы).

Использование эритроцитов для оценки электронакцепторных свойств химических соединений в первичном скрининге

Первичный скрининг электронакцепторных соединений, которые способны вступать в окислительно-восстановительные реакции с внутриэритроцитарными редокс-системами, представляет интерес по целому ряду причин. Так, к электронакцепторным соединениям относится значительное число лекарственных средств широкого применения. Это определяет актуальность изучения механизмов взаимодействия конкретных лекарств с редокс-системами различных клеток. Кроме того, любые химические соединения, обладающие высокой реакционной способностью по отношению к внутриклеточным редокс-системам, заведомо являются веществами с ярко выраженной биологической активностью.

Потенциометрическая регистрация скорости восстановления феррицианида калия различными клеточно-тканевыми препаратами может быть использована в качестве одного из способов первичных испытаний.

Первичным признаком влияния химических соединений на редокс-баланс эритроцитов служит наличие изменений в регистрируемой скорости восстановления феррицианида калия в ответ на внесение соединения, что свидетельствует об изменениях условий переноса восстановительных эквивалентов через мембрану клеток на внешнюю редокс-систему.

Аскорбиновая кислота или метиленовый синий являются активаторами ГМФШ эритроцитов (см. гл. 5). Из рис. 42 и 43 следует, что их действие на редокс-баланс эритроцитов можно исследовать как во времени, так и в зависимости от концентрации присутствующего агента.

Метод позволяет в первом приближении провести оценку места действия соединения при комбинации с другими изменениями (содержание SH-глутатиона, метгемоглобина). Так, искусственный акцептор феназинметосульфат переносит восстановительные эквиваленты не только из системы глутатиона, но и с гемоглобина. Это выясняется по появлению метгемоглобина и по слабой зависимости эффекта от присутствия глюкозы.

Для первичной классификации химических соединений по феррицианидному методу можно использовать и сравнение действия соединения на измеряемый параметр при разном содержании кислорода в среде инкубации.

Метаболические превращения электроакцепторных соединений типа производных нитрофурана или нитроимидазола зависят от того, при каком содержании кислорода происходит их контакт с клетками. Действие таких соединений на скорость восстановления феррицианида калия меняет знак при переходе к гипоксическим условиям. Это связано с тем, что окисленные формы таких соединений конкурируют с феррицианидом за восстановительные эквиваленты, а восстановленная форма способна окисляться молекулярным кислородом.

Точно так же можно отличить и соединения, создающие «окислительную нагрузку» по типу бутилгидроперекиси — соединения, являющегося субстратом для глутатионпероксидазы и истощающего внутриклеточный запас SH-глутатиона в ходе ферментативной реакции без непосредственного взаимодействия с внутриклеточными редокс-системами.

Как следует из данных рис. 43, уменьшение измеряемой величины в присутствии таких соединений не может быть снято добавкой метиленового синего или аскорбиновой кислоты, что, как следует из обсуждения, приведенного в гл. 5, свидетельствует об исчерпании внутриклеточного запаса восстановительных эквивалентов, регенерируемых ГМФШ эритроцитов. Действие же соединений типа бутилгидроперекиси не зависит от pO_2 , при котором производится измерение, поскольку регенерация SH-глутатиона в эритроците не зависит от кислорода.

Таким образом, использование феррицианидного метода в первичном скрининге позволяет установить наличие взаимодействия электроакцепторных соединений с восстановительными системами эритроцитов и в ряде случаев провести грубую идентификацию места действия соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрение материалов, касающихся кислородзависимых процессов, позволяет сделать выводы об их значимости в жизнедеятельности клетки.

Исключительная роль кислорода в процессах биологического окисления связана с его физико-химическими свойствами, благодаря чему живые организмы в ходе эволюции использовали эти реакции с самыми различными целями, не ограниченными образованием энергии и направленными в конечном счете на обеспечение своих основных функций, приуроченных к определенным субклеточным структурам.

В силу этого становится понятной значимость вопроса о снабжении тканей и клеток кислородом. Рассмотренный материал приводит к заключению о том, что его поступление в клетку с помощью простой и облегченной диффузии является регулируемым процессом. Кислородный гомеостаз обеспечивает поддержание оптимального градиента напряжения на участке капилляр — клетка, в формировании которого постулируется участие внутриклеточных молекулярных сенсоров кислорода. Ведущее место среди претендентов на эту роль отводится цитохромоксидазе.

Процесс утилизации кислорода клеткой («клеточное дыхание») складывается из многих кислородзависимых реакций, локализованных в разных ее компартментах, соотношение которых может меняться в связи с изменением функционального состояния клетки, обеспечения субстратами и пр.

Согласно современным представлениям, скорость дыхания зависит от состояния фосфорилирования адениннуклеотидной системы немитохондриального пула и соотношения окисленных и восстановленных форм дыхательных переносчиков I и III изопотенциальных групп дыхательной цепи. Лимитирующим звеном процесса является терминальная стадия взаимодействия цитохром с оксидазы с кислородом, которая и ответственна за кинетический контроль дыхания. Принципы действия последнего остаются

общими как *in vivo*, так и *in vitro*. Тем не менее в интактной клетке значение отдельных параметров, включающихся в контроль дыхания, может резко отличаться от параметров изолированных митохондрий. Речь идет о парадоксальном факте с точки зрения представлений, сложившихся при работе с изолированными митохондриями: стационарное состояние, характеризующее норму, отличается чрезвычайно высокой степенью восстановленности цитохрома a , a_3 почти во всех известных тканях и относительно более высокой степенью окисленности пиридиннуклеотидов дыхательной цепи сравнительно с митохондриями. Реализация специфической функции клетки (переход от покоя к активности, восстановление после нее, возникновение потенциала действия и т. д.) сопровождается фазными окислительно-восстановительными превращениями дыхательных переносчиков, направление которых может отличаться от условий *in vitro*. В настоящее время пока еще нет объяснений этому феномену. Однако очевидно, что это явление не уменьшает ни сродства цитохромоксидазы к кислороду, ни изменений свободной энергии в терминальном участке. Оно не является также следствием внутриклеточной гипоксии. Хотя перенос электронов в дыхательной цепи *in vivo* поставлен в иные условия, нежели *in vitro*, образование АТФ в клетке точно согласовано с ее потребностями в энергии.

Регуляция дыхания в области низких значений pO_2 осуществляется через изменение редокс-состояния цитохрома c (его увеличение), которое начинается задолго до того, как кислород становится лимитирующим фактором, и раньше, чем произойдет увеличение $[ADP]$ и $[F_N]$, снижающее величину отношения $[ATP]/[ADP]$ $[F_N]$. Значимые изменения пиридиннуклеотидного пула дыхательной цепи наблюдаются лишь в области очень низких pO_2 (менее 20 мкМ). Благодаря этому в условиях гипоксии длительное время удается поддерживать постоянными скорость дыхания и синтез АТФ. Этот же механизм регуляции дыхания подразумевает, что не может быть одного значения кажущейся $K_m(O)$ для сложной биологической системы. Оно должно отличаться для каждого конкретного состояния, что и подтверждается экспериментально. Вариабельность кажущейся $K_m(O)$ в клетке является одним из механизмов ее приспособления к условиям острой кислородной недостаточности, который позволяет ей выжить при острой гипоксии и говорит о том, что

цитохромоксидаза не подчиняется простой кинетике Михаэлиса—Ментена. Следовательно, использование этой величины для определения чувствительности клетки к гипоксии, видимо, не оправдано. Это можно сказать и по поводу понятия «критическое напряжение кислорода» — термина, предполагающего, что имеется некоторое фиксированное значение pO_2 , выше которого ткань находится в условиях нормальной оксигенации, а ниже — в гипоксической зоне. В действительности существует широкий ряд значений pO_2 , в пределах которых ткань может изменять свою метаболическую активность, чтобы компенсировать субоптимальное снабжение кислородом.

Это заключение согласуется с данными о возможности относительного изменения активности различных участков дыхательной цепи и направления метаболических потоков, обеспечивающих ее при изменении функционального состояния. Так, при переходе в область низких значений pO_2 перестройка работы дыхательной цепи касается ограничения переноса электронов через НАД-зависимый участок и усиления сукцинатоксидазной активности. Эти изменения могут рассматриваться как неспецифическая защитно-компенсаторная реакция неадаптированных к гипоксии клеток. Адаптация к гипоксии, наоборот, приводит к восстановлению и резкой активации НАД-зависимого окисления, которое перестает быть чувствительным к низким значениям pO_2 . Исследование зависимости V_d/pO_2 в модельных системах (тканевые срезы) позволяет предполагать возможность участия в регуляции дыхания не только цитохромоксидазы, но и других оксидаз клетки.

Наряду с дыхательной цепью митохондрий мощным потребителем кислорода является система микросомального окисления, широко представленная в самых различных клетках млекопитающих. Наибольшая ее активность связывается с гепатоцитом. Кислородзависимые процессы, обусловленные монооксигеназными реакциями эндоплазматического ретикулума клеток печени, могут быть связаны с потреблением 10—40% от всего кислорода, утилизируемого клеткой. Они составляют часть ее цитохремрезистентного дыхания. В него же входят и другие немитохондриальные кислородзависимые реакции. Субстраты цикла трикарбоновых кислот могут активировать либо подавлять процессы микросомального окисления, причем направленность их действия зависит от функционального состояния клетки. Существует тесное взаимодействие между дыхательной

цепью и активностью системы микросомального окисления, выражающееся в обмене между ними восстановительных эквивалентов. Степень этого взаимодействия зависит от метаболического и функционального состояний клетки.

В монографии в качестве частного случая рассматривались митохондриально-микросомальные взаимодействия в условиях, когда промежуточный продукт окисления ксенобиотика является субстратом дыхательной цепи (формальдегид). В наших более поздних исследованиях, которые уже не вошли в эту книгу, показано, что взаимодействия могут быть резко отличными от рассмотренного, если промежуточный продукт ксенобиотиков метаболизируется только во внемитохондриальном пространстве.

O₂ не лимитирует активность микросомального окисления в широких пределах его значений, однако при низких рO₂ относительная окислительная мощность этой системы увеличивается за счет ограничения работы дыхательной цепи в этих условиях. В этом случае субстраты монооксигеназных реакций могут восстанавливать дыхание клетки.

В круг рассматриваемых нами явлений включены реакции образования H₂O₂ и других промежуточных продуктов восстановления кислорода, являющихся обязательными интермедиатами нормальной жизнедеятельности клетки и составляющих еще одну большую группу кислородзависимых процессов. Генерация, например, H₂O₂ в перфузируемой печени в определенных ситуациях может быть ответственной за 5—50% утилизируемого органом кислорода. Методические сложности, связанные с прижизненной идентификацией промежуточных продуктов восстановления в клетке, явились, видимо, причиной того, что они попали под пристальное внимание широкого круга исследователей лишь в самые последние годы. Несмотря на это, уже сейчас очевидна их исключительная роль во многих метаболических процессах, связанных с функцией клетки. Физиологические концентрации промежуточных продуктов восстановления кислорода необходимы для поддержания активности дыхательной цепи, монооксигеназных реакций, различных внутриклеточных синтезов, оксидации многих веществ, в том числе и этанола, антимикробной активности фагоцитирующих клеток, овуляции и пр. Поддержание стационарной концентрации этих продуктов, осуществляемое с помощью ферментов каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы, имеет принципиальное значение, так как в патологических условиях

дисбаланс этой системы может привести к накоплению свободнорадикальных продуктов и проявлению их токсического эффекта, приводящего к гибели клетки. Дыхательная цепь принимает самое непосредственное участие в регуляции содержания этих продуктов.

Таким образом, кислородзависимые процессы в клетке, имеющие специфическую или неспецифическую компартиментализацию, находятся в теснейшем взаимодействии, основанном не на принципе альтернативности, исключаящей активность какого-либо из них, а на кооперации и согласовании их работы друг с другом. Связующим звеном между ними является редокс-потенциал клетки, контролируемый специальными системами и метаболическими путями. Дыхательная цепь занимает центральную роль во всем этом сложном механизме не только потому, что она является главным потребителем кислорода, но и в связи с тем, что она непосредственно участвует в этой регуляции, способствуя в определенных условиях снижению редокс-потенциала клетки либо, наоборот, его увеличению.

В связи с обсуждаемым вопросом можно предположить, что межклеточный обмен восстановительными эквивалентами, показанный нами, является еще одним путем, включающимся в регулирование внутриклеточного редокс-потенциала. Из приведенных нами материалов по этому вопросу видно, что все испытанные объекты (эритроциты, асцитные клетки Эрлиха, гепатоциты, дрожжи) оказались способными восстанавливать непроникающий в клетки окислитель — феррицианид калия. Причем для объектов, содержащих митохондрии, переносу восстановительных эквивалентов на внешний окислитель благоприятствует всякое ограничение электронного транспорта в дыхательной цепи. Вполне возможно, что этот путь может быть чрезвычайно существенным для клетки при гипоксии. По этой причине обмен восстановительными эквивалентами между клетками и окружающей средой можно рассматривать как еще один процесс, участвующий в регуляции клеточного и тканевого дыхания. Естественно, что для окончательного утверждения этой гипотезы требуется продолжение исследований с целью получения подтверждений об универсальности явления и его воспроизводимости на самых различных типах клеток.

Таким образом, налицо тесная метаболическая и функциональная связь различных внутриклеточных компартов, координируемая системами регуляции и объединяемая в единую систему обеспечения клеток кислородом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Л. А., Шпильберг П. И. Электрические потенциалы мозга животных при анемии.— В кн.: Материалы по физиологии рецепторов. М.: Медгиз, 1948, с. 91—102.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975.
3. Арчаков А. И. Межмембранный перенос электронов и латеральная подвижность белков микросомальной мембраны.— В кн.: Тез. докл. IV Всесоюз. биохим. съезда Л.: Наука, 1979, т. 1, с. 24—30.
4. Арчаков А. И., Карякин А. В., Скулачев В. П. Перенос электронов между мембранами микросом и митохондрий.— Докл. АН СССР, 1973, № 1, т. 209, с. 221—223.
- 4а. Азмеров Р. Н. Полярнографическая ячейка с регулируемой подачей газов.— В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом. М.: Наука, 1973, с. 65—70.
5. Балмуханов Б. С., Замула С. В., Атауллаханов Ф. И. Потенциометрическое исследование окислительно-восстановительных систем эритроцитов человека с помощью феррицианида калия.— Биохимия, 1979, т. 45, вып. 5, с. 945—949.
6. Балмуханов Б. С., Попова О. А., Уголев А. Т. и др. Зависимость действия амидопирина на дыхательные системы тканевых препаратов печени от интенсивности внемитохондриального поглощения кислорода.— Хим.-фармакол. журн., 1978, № 5, с. 16—21.
7. Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Исследование кинетических характеристик скорости дыхания переживающих тканевых препаратов печени.— Биофизика, 1979, т. 24, № 4, с. 779.
8. Балмуханов Б. С., Уголев А. Т., Витова И. Л. и др. Использование кинетических характеристик дыхания как показатель активности различных окислительных ферментных систем клетки.— В кн.: Окислительные ферменты животной клетки и регуляция их активности. Горький, 1978, с. 36—37.
9. Басенова А. Г., Биршанова Н. Х., Балмуханов Б. С. Изучение восстановительной активности клеток дрожжей по отношению к феррицианиду калия.— Докл. ВАСХНИЛ, 1980, № 12, с. 47—49.
10. Березовский В. А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. Киев: Наукова думка, 1975. 260 с.
11. Власова И. Г., Лукьянова Л. Д., Уголев А. Т. Морфологические, электрофизиологические и метаболические показатели функционирования нейронов мозжечка в условиях культуры ткани.— Цитология, 1978, № 4, т. 20, с. 405—410.
12. Гринберг Л. Н. Регуляция дыхания митохондрий кислородом.— В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом. М.: Наука, 1973, с. 129—146.
13. Деркачев Э. Ф., Сидорова Н. Д. О возможности участия каталазы в процессах окислительного фосфорилирования.— В кн.: Митохондрии. М.: Наука, 1967, с. 71—76.
14. Дынник В. В., Маевский Е. И. Реакция энергетического метаболизма мышц на увеличение активности АТФазы, математическая модель.— В кн.: Математическое моделирование биологических процессов. М.: Наука, 1979, с. 52—70.
15. Дынник В. В., Сельков Е. Е. Поведение гликолитической системы и обмена пуриновых нуклеотидов в условиях стрессовой АТФазной нагрузки.— В кн.: Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. М.: Наука, 1978, с. 51—66.
16. Дынник В. В., Сельков Е. Е., Овчинников И. А. Влияние рециркуляции на механизм стабилизации АТФ в цитоплазме. Математические модели.— Биохимия, 1977, т. 42, вып. 9, с. 1567—1577.
17. Дынник В. В., Темнов А. В. Математическая модель окисления пировата в митохондриях печени.— Биохимия, 1977, т. 42, вып. 6, с. 1030—1044.
18. Дюссе Г., Швейон П. Влияние кислородного давления на дыхание клубней картофеля.— В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М.: Наука, 1970, с. 358—368.
19. Евтодченко Ю. В., Мозова Е. Н. Количественное определение соотношений цитохромов в митохондриях.— В кн.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота. М.: Наука, 1967, с. 35—48.
20. Емельянов Н. А., Богданова Т. С., Гарина И. А. и др. О возможности моделирования изменений обмена веществ в нервной ткани.— В кн.: Гипофизарноадреналовая система и мозг. Л.: Наука, 1976, с. 156—173.
21. Зинченко В. П. Изменение люминесценции пиридиннуклеотидов мышечной клетки в ответ на кратковременную стимуляцию.— В кн.: Биофизика живой клетки. Пушино, 1972, т. 3, с. 76—80.
- ✓ 22. Зинченко В. П. Прижизненное исследование пиридиннуклеотидов и флавопротеидов мышцы: Дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 1975, 135 с.
- ✓ 23. Зинченко В. П., Захаров С. Д. Параллельные микроспектрофлуориметрические и полярнографические исследования регуляции энергетики мышечной клетки.— В кн.: Биофизика живой клетки. Пушино, 1973, т. 4, с. 123—129.
24. Иванов К. П., Кисляков Ю. Я. Энергетические потребности и кислородное обеспечение головного мозга. Л.: Наука, 1979. 212 с.
25. Камия Н. Движение протоплазмы. М.: ИЛ, 1962. 306 с.
26. Карнаузов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. М.: Наука, 1978, с. 207.
27. Карнаузов В. Н. Функции каротиноидов в клетках животных. М.: Наука, 1973. 104 с.
28. Карнаузов В. Н., Зинченко В. П. Люминесцентные спектральные исследования путей терминального окисления при изменении функциональной активности одиночной мышечной клетки.— Цитология, 1971, т. 13, с. 1243—1249.
29. Карнаузов В. Н., Лукьянова Л. Д., Хаспекоев Л. Г. и др. Динамика окислительно-восстановительных состояний срезов

- КГМ.— В кн.: Биофизика живой клетки. Пуцнино, 1973, т. 3, с. 118—123.
- 29а. Каюшин Л. П., Бржевальская О. Н., Неделкина О. С. и др. Участие свободных радикалов в синтезе АТФ.— Биофизика, 1978, т. 23, с. 915—916.
 30. Коваленко Е. А. О теории газов в организме.— В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М.: Наука, 1973, с. 192—212.
 31. Коваленко Е. А., Черняков И. Н. Кислород тканей при экстремальных факторах полета. М.: Наука, 1972, 262 с.
 - 31а. Козлов Ю. П. Свободнорадикальное окисление липидов в биомембранах в норме и при патологии.— В кн.: Биоантиоксиданты. М.: Наука, 1975, с. 5—14.
 32. Кондрашова М. Н. Метаболические состояния митохондрий и основные физиологические состояния живой ткани.— В кн.: Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем. М.: Наука, 1969, с. 135—139.
 33. Кондрашова М. Н. Регуляция дыхания при усиливающемся воздействии на клетку.— Биофизика, 1970, т. 15, с. 312—317.
 34. Кондрашова М. Н. Градации метаболических состояний митохондрий и реактивность ткани.— В кн.: Митохондрии. М.: Наука, 1971, с. 24—40.
 35. Кондрашова М. Н. Принципиальные преимущества полярографического изучения дыхания перед манометрическим.— В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. Пуцнино, 1973, с. 86—92.
 36. Кондрашова М. Н. Основные понятия биоэнергетики, используемые в функциональных исследованиях.— В кн.: Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма. Пуцнино, 1975, с. 67—82.
 37. Котельникова А. В., Звягильская Р. А. Биохимия дрожжевых митохондрий. М.: Наука, 1973, 240 с.
 38. Козн Е., Козн С., Торелл Б. Сканирование спектра флуоресценции НАДФН в отдельной живой клетке за 32 мсек.— Приборы для научных исследований, 1973, т. 44, № 12, с. 99—105.
 39. Крог А. Анатомия и физиология капилляров. М., 1927. 184 с.
 40. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. 325 с.
 41. Курпьянов В. В., Сеппет Э. К., Емелин И. В. и др. Регуляция синтеза креатинфосфата, сопряженного с пируваткиназной реакцией в цитозоле из клеток миокарда. В кн.: Тез. докл. IV Всесоюз. биохим. съезда. Л.: Наука, 1979, т. 2, с. 104—105.
 42. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. 957 с.
 43. Лукьянова Л. Д. Окислительный метаболизм и реактивность нервной ткани в переживающих препаратах и в условиях целостного организма. Дис. ...докт. биол. наук. М., 1971. 365 с.
 44. Лукьянова Л. Д. Закономерности регуляции окислительно-восстановительных превращений в тканях во время аноксии и в восстановительный после нее период.— В кн.: Биохимия гипоксии. Горький, 1975, с. 22—26.
 45. Лукьянова Л. Д. Роль митохондрий в фазных ответных реакциях переживающей нервной ткани.— В кн.: Регуляция энергетического обмена и устойчивость организма. Пуцнино, 1975, с. 150—153.
 46. Лукьянова Л. Д., Дудченко А. М., Попова О. А. и др. Регулирование обмена восстановительными эквивалентами между митохондриальными и микросомальными редокс-цепями в гепатоцитах.— В кн.: Тез. докл. IV Всесоюз. биохим. съезда. Л.: Наука, 1979, т. 2, с. 108—109.
 47. Лукьянова Л. Д., Ененко С. О., Хаспеков Л. Г. и др. Метаболическая реактивность культивируемой нервной ткани при электростимуляции.— Биофизика, 1973, т. 18, с. 3—8.
 48. Лукьянова Л. Д., Карнаухов В. Н., Зинченко В. П. и др. Изменение редокс-реакций ПН срезов коры головного мозга крыс на добавление янтарной кислоты, амитала и пирувата в зависимости от времени переживания срезов.— В кн.: Терапевтическое действие янтарной кислоты. Пуцнино, 1976, с. 146—150.
 49. Лукьянова Л. Д., Попова О. А., Романова В. Е. и др. О факторах, влияющих на регуляцию процессов биологического окисления в тканевых препаратах.— В кн.: Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. М.: Наука, 1978, с. 90—101.
 50. Лукьянова Л. Д., Хаспеков Л. Г., Папулова Л. М. Дыхательные осцилляции и метаболизм изолированной нервной ткани в состоянии покоя и при электростимуляции.— Биофизика, 1971, т. 16, с. 872—877.
 51. Лукьянова Л. Д., Шунгская В. Е., Ененко С. О. и др. Исследование дыхательного метаболизма культивируемой нервной ткани млекопитающих в покое и при возбуждении.— В кн.: Физико-химические основы возбуждения. М.: Наука, 1970, с. 62—67.
 52. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназа. Новосибирск: Наука, 1978. 256 с.
 53. Манойлов С. Е. О роли каталазы в процессах тканевого дыхания.— В кн.: Митохондрии. М.: Наука, 1967, с. 61—68.
 54. Манойлов С. Е., Комов В. П., Сидорова Н. Д. и др. Влияние различных фракций гемолизата крови, обладающих каталазной активностью, на процессы сопряженного окислительного фосфорилирования митохондрий печени.— Там же, 1969, с. 46—50.
 55. Миронова Г. Д. Метмиоглобин и перекисные соединения в митохондриях.— Там же, 1971, с. 169—173.
 56. Миронова Г. Д. Отношение пероксидазных систем к фосфорилирующему окислению.— Там же, 1972, с. 81—85.
 57. Миронова Г. Д., Кондрашова М. Н., Косая Т. А. Участие метмиоглобина в деятельности фосфорилирующей дыхательной цепи.— Там же, 1969, с. 54—60.
 58. Москаленко Ю. Е., Вайнштейн Г. Б., Демченко И. Т. и др. Внутривещная гемодинамика: биофизические аспекты. Л.: Наука, 1975, 202 с.
 59. Мозгова Е. Н. Использование различных тканевых препаратов при полярографическом изучении дыхания и сопряженных с ним реакций.— В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М.: Наука, 1973, с. 175—189.
 60. Мозгова Е. Н. Дыхание митохондрий в тканевых препаратах.— В кн.: Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. М.: Наука, 1978, с. 67—72.
 61. Мозгова Е. Н., Хакина И. В. Сравнение чувствительности к амиталу и к разобщителям дыхания кусочков печени на эндогенных субстратах, пирувате и НАДН.— В кн.: Митохондрии. М.: Наука, 1974, с. 71—75.

62. Ньюсхолм Э., Стюарт К. Регуляция метаболизма. М.: Мир, 1977. 407 с.
63. Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений. М.: Медицина, 1973. 288 с.
64. Покровский А. А., Гаппаров М. М., Левин Л. Г. и др. Участие дыхательной цепи митохондрий в процессе секреции соляной кислоты в слизистой желудка.— В кн.: Митохондрии. М.: Наука, 1974, с. 119—122.
65. Работникова И. Л. Роль физико-химических условий (pH и H_2) в жизнедеятельности микроорганизмов. М.: Изд-во АН СССР, 1957. 275 с.
66. Райзман Л. М., Белова В. С., Борукаева М. Р. и др. Кинетика гидроксипероксида в микросомах.— Биохимия, 1974, т. 36, с. 674—679.
67. Ратникова Л. А., Чистяков В. В., Ягузинский Л. С. Регуляторные взаимодействия дыхательной цепи МХ и окислительной системы эндоплазматического ретикула.— Биохимия, 1978, т. 43, вып. 10, с. 1809—1815.
68. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. М.: Мир, 1979. 216 с.
69. Сакс В. А., Розенштраух В. А., Смирнов В. Н. и др. Внутриклеточные системы транспорта энергии в миокарде в норме и патологии.— В кн.: Окислительные ферменты животной клетки и регуляции их активности. Горький, с. 14—15.
70. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 156 с.
71. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука, 1969. 440 с.
72. Скулачев В. П. Трансформация энергии в клетке. М.: Наука, 1972. 203 с.
73. Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. М.: Наука, 1977. 93 с.
74. Терапевтическое действие янтарной кислоты. Пушино, 1976. 234 с.
- 74а. Титовец Э. П. Полярографическая камера с подачей кислорода.— В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М.: Наука, 1973, с. 62—65.
75. Хесс В. Реакции компонентов дыхательной цепи в неповрежденных клетках.— В кн.: Труды V Междунар. биохим. конгр. М., 1962, т. 5, с. 330—337.
76. Черноградская Н. А., Розанов Ю. М., Богданова М. С. и др. Ультрафиолетовая флуоресценция клетки. Л.: Наука, 1978. 215 с.
77. Шошенко К. А. Кровеносные капилляры. Новосибирск: Наука, 1975. 374 с.
78. Энгельгард В. А. Анаэробный распад и аэробный ресинтез пироглютата в красных кровяных клетках птиц.— Казан. мед. журн., 1931, № 27, с. 496—502.
79. Ягузинский Л. С. Ингибиторный анализ на митохондриях.— В кн.: Структура и функция ферментов. М.: Изд-во МГУ, 1973, с. 106—132.
80. Aebi H., Suter H. Über die peroxydempfindlichkeit von Akatalasie-Erythrocyten.— Humangenetik, 1966, Bd. 2, S. 328—343.
81. Aebi H., Suter H., Feinstein R. N. Activity and stability catalase

- in blood and tissues of normal and acatalasemic mice.— Biochem. Genet., 1968, vol. 2, p. 245—257.
82. Allen R. C., Stjernholm R. L., Steele R. H. Evidence for generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes.— Biochem. and Biophys. Res., Commun., 1972, vol. 47, p. 679—684.
83. Alvares A. P., Andersen K. E., Conney A. H. et al. Interactions between nutritional factors and drug biotransformation in man.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, vol. 73, p. 2501.
84. Atkinson D. E. Regulation of enzyme activity.— Annu. Rev. Biochem., 1966, vol. 35, p. 85—124.
85. Azzi A., Loschen G., Flohe H. Structural and functional aspects of H_2O_2 formation in the mitochondrial membrane.— In: Glutathione/Ed. L. Flohe et al. Stuttgart: Thieme, 1974, p. 237—242.
86. Babior B. M., Curnutte Y. T., McMurrich B. J. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils.— J. Clin. Invest., 1976, vol. 58, p. 984—996.
87. Babior B. M., Kipnes R. S. Superoxydeforming enzyme from human neutrophils.— Blood, 1977, vol. 50, p. 517—524.
88. Babior B. M., Kipnes R. C., Curnutte J. T. Biological defence mechanisms.— J. Clin. Invest., 1973, vol. 52, p. 741—744.
89. Bachelard H. S., Lewis L., Pontén U. et al. Mechanisms activating glycolysis in the brain in arterial hypoxia.— J. Neurochem., 1974, vol. 22, p. 395—401.
90. Bachmann E., Goldberg L., Digiacomo P. Aspects of the determination of biphenyl hydroxylase activity in liver homogenates.— Exp. and Mol. Pathol., 1970, vol. 12, p. 212—224.
91. Bachner R. L., Gilman L. N., Kasnovsky M. L. Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes.— Comparative studies.— J. Clin. Invest., 1970, vol. 49, p. 692—700.
92. Banaschak H., Hänel A. K. Über den Mechanismus der Fixation von Methylenblau und die Erythrozytenoberfläche.— Acta biol. et med. germ., 1964, Bd. 12, S. 90—98.
93. Bänder J., Kiese F. Die Wirkung Sauerstoffübertragenden.— Arch. exp. und Pathol. Pharm., 1955, Bd. 224, S. 312—317.
94. Banks P., Bartley W., Birt L. M. The biochemistry of the tissues. L.: J. Wiley and Sons, 1976. 528 p.
95. Bartoli G. M., Dani M. A., Galleotti T. et al. Respiratory activity of Ehrlich ascites tumor cell nuclei.— Ztschr. Krebsforsch., 1975, Bd. 83, S. 223—231.
96. Bartoli G. M., Galeotti T., Azzi A. Production of superoxide anions and hydrogen peroxide in Ehrlich ascites tumor cell nuclei.— Biochim. et biophys. acta, 1977, vol. 497, p. 622—626.
97. Beiss I., Newsholme E. A. The contents of adenine nucleotides phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates.— Biochem. J., 1975, vol. 152, p. 23—32.
98. Belinsky S. A., Reinke L. A., Kauffman F. C. et al. Inhibition of mixed — function oxidation of p — nitroanisole in perfused rat liver by 2,4-dinitrophenol.— Arch. Biochem., 1980, vol. 204, p. 207—213.
99. Bendall D. S., Bonner W. D. Cyanide insensitive respiration in plant mitochondria.— Plant Physiol., 1974, vol. 47, p. 236—245.
100. Berry M., Kun E. Ethanol oxidation by isolated rat liver cell.— Europ. J. Biochem., 1978, vol. 89, p. 237—241.

101. *Biaglow J. E., Nygaard O. F.* The use of oxidant «Diamide» for studying the nonmitochondrial reducing capacity of Ehrlich ascite tumor cells.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1973, vol. 54, p. 874—881.
102. *Bicher H. I.* Autoregulation on oxygen supply to brain tissue.— In: *Oxygen transport to tissue* / Ed. H. I. Bicher et al. N. Y.: Plenum Press, 1973, vol. 1, p. 215—222.
103. *Bicher H. I., Bruley D., Roneau D.* et al. Regulatory mechanism of brain oxygen supply.— In: *Oxygen supply* / Ed. H. Kessler. München: Schwerzenberg, 1974, p. 180—185.
104. *Bickel M. H.* Liver Metabolic Reactions.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1971, vol. 148, p. 54—62.
105. *Biological Hydroxylation Mechanisms* / Ed. G. S. Boyd et al. N. Y.: Acad. Press, 1972, 215 p.
106. *Blasie Y. K., Erecińska M., Sautnells S., Leigh Y. S.* The structure of a cytochrome oxidase-lipid model membrane.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, vol. 501, p. 33—52.
107. *Bliss D., Skinner D.* Tissue respiration in invertebrates. N. Y.: Amer. Mus. Natur. Hist., 1963, 139 p.
108. *Blond D. M., Whittam R.* The regulation on kidney respiration by sodium and potassium ions.— *Biochem. J.*, 1964, vol. 92, p. 158—168.
109. *Boveris A.* Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide.— In: *Tissue hypoxia and ischemia* / Ed. M. Reivich et al. N. Y.: Plenum Press, 1977, p. 67—84.
110. *Boveris A., Cadenas E.* Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration.— *FEBS Lett.*, 1975, vol. 54, p. 311—314.
111. *Boveris A., Cadenas E., Stoppani O. M.* Rate of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide.— *Biochem. J.*, 1976, vol. 156, p. 435—444.
112. *Boveris A., Chance B.* The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen.— *Biochem. J.*, 1973, vol. 134, p. 707—716.
113. *Boveris A., Chance B.* Optimal rates of hydrogen peroxide production in hyperbaric oxygen.— In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 207—214.
114. *Boveris A., Oshino N., Chance B.* The cellular production of hydrogen peroxide.— *Biochem. J.*, 1972, vol. 128, p. 617—630.
115. *Boveris A., Stoppani O. M.* Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*.— *Experientia*, 1977, vol. 33, p. 1306—1308.
116. *Brauser B., Sies H., Bücher Th.* Action of amobarbital on microsomal and mitochondrial respiratory state in perfused rat liver with and without phenobarbital induction.— *FEBS Lett.*, 1969, vol. 2, p. 170—172.
117. *Brauser B., Sies H., Bücher Th.* Reduction kinetics and content of cytochrome P-450 by application of dual wavelength techniques to hemoglobin — free perfused rat liver.— *FEBS Lett.*, 1969, vol. 2, p. 167—169.
118. *Brauser B., Versmold H., Bücher Th.* Redox kinetics and redox state of P-450 in whole liver.— *Hoppe seyley's Ztschr. physiol. und Chem.*, 1968, Bd. 349, S. 1589—1591.
119. *Brodie B. B., Gillette J. R., La Du B. N.* Enzymatic metabolism

- of drugs and other foreign compounds.— *Annu. Rev. Biochem.*, 1958, vol. 27, p. 427—454.
120. *Bücher T., Brauser B., Conze A.* et al. State of oxidation — reduction and state of binding in the cytosolic NADH — system as Disclosed by equilibration with extracellular lactate/pyruvate in hemoglobin — free perfused rat liver.— *Europ. J. Biochem.*, 1972, vol. 27, p. 301—317.
121. *Bull R. J., Lütkenhoff S. S.* Early changes in respiration aerobic glycolysis and cellular NAD(P)H in slices of rat cerebral cortex exposed to elevated concentrations of potassium.— *J. Neurochem.*, 1973, vol. 21, p. 913—922.
122. *Bull R. J.* Cytochrome redox potential dependence on substrate in rat cerebrale cortex slices importance of cytoplasmic NAD(P)H and potassium.— *J. Neurochem.*, 1976, vol. 26, p. 149—156.
123. *Burk R. F., Nishiki K., Laurence R. A.* et al. Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver.— *J. Biol. Chem.*, 1978, vol. 253, p. 43—46.
124. *Cadenas E., Boveris A.* Enhancement of Hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin — supplement mitochondria.— *Biochem. J.*, 1980, vol. 188, p. 31—37.
125. *Callow A. B.* On catalase in bacteria and its relation to anaerobiosis.— *J. Pathol. and Bacteriol.*, 1923, vol. 23, p. 320—325.
126. *Canady W. Y., Robinson D. A., Colby H. D.* A partition model for hepatic cytochrome P-450 — hydrocarbon complex formation.— *Biochem. Pharm.*, 1974, vol. 23, p. 3075—3078.
127. *Cantrell E., Bresnica E.* Benzpyrene hydroxylase activity in isolated parenchymal and nonparenchymal cell of rat liver.— *J. Cell Biol.*, 1972, vol. 52, p. 316—321.
128. *Cederbaum A. I., Dicker E., Lieber C. S.* et al. Ethanol oxidation by isolated hepatocytes from ethanol — treated and control rats.— *Biochem. Pharm.*, 1978, vol. 27, p. 7—15.
129. *Cederbaum A. I., Dicker E., Rubin E.* Transfer and reoxidation of reducing equivalents as the rate-limiting steps in the oxidation of ethanol by liver cells isolated from fed and fasted rats.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, vol. 183, p. 638—646.
130. *Cederbaum A. I., Dicker E., Rubin E.* et al. Effect of thiourea on microsomal oxidation of alcohols and associated microsomal functions.— *Proc. Amer. Chem. Soc.*, 1979, vol. 18, p. 1187—1195.
131. *Cederbaum A. I., Lieber C. S., Rubin E.* Effects of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions damage to coupling site I.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1974, vol. 165, p. 560—569.
132. *Cederbaum A. I., Lieber C. S., Rubin E.* Effect of chronic ethanol consumption and acetaldehyde on partial reactions of oxidative phosphorylation and CO₂ production from citric acid cycle intermediates.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1976, vol. 176, p. 525—538.
133. *Cederbaum A. I., Rubin E.* The Oxidation of acetaldehyde by rat hepatic, non-hepatic and tumor mitochondria.— In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1978, vol. 3, p. 202—218.
134. *Chalazonitis N.* Chemoreception and transduction on neuronal models.— In: *Tissue hypoxia and ischemia* / Ed. M. Reivich. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977, p. 85—100.

135. *Chance B.* The iron-containing enzyme C.— In: The enzymes / Ed. J. B. Sumner et al. N. Y.: Acad. Press, 1954, p. 428—453.
136. *Chance B.* Reaction of oxygen with the respiratory chain in cells and tissues.— *J. Gen. Physiol.*, 1965, vol. 49, p. 163—188.
137. *Chance B.* Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells.— *Nature*, 1952, vol. 169, N 4293, p. 215—221.
138. *Chance B.* The state of catalase in the respiring bacterial cell.— *Science*, 1952, vol. 116, p. 202—203.
139. *Chance B.* Units of biological structure and function / Ed. O. H. Goebler. N. Y.: Acad. Press, 1956, p. 447—462.
140. *Chance B.* Phosphorylation efficiency of the intact cell. III. Phosphorylation and dephosphorylation in yeast cells.— *J. Biol. Chem.*, 1959a, vol. 234, p. 3041—3043.
141. *Chance B.* Quantitative aspects of the control of oxygen utilization.— In: Ciba foundation symposium on the regulation of cell metabolism / Ed. Y. Wolsteholme et al. L.: Y. and A. Churchill, 1959, p. 91—129.
142. *Chance B., Boveris A.* Hypoxia and hydroperoxide metabolism.— In: Extrapulmonary manifestations of respiratory disease / Ed. E. D. Rubin. N. Y.: Dekker, 1978, p. 185—237.
143. *Chance B., Boveris A., Oshino N.* et al. The nature of the catalase intermediate in the biological function.— In: Oxidases and related redox systems / Ed. I. E. King et al. Baltimore: Univ. Park Press, 1973, p. 350—353.
144. *Chance B., Connelly C. M.* A method for the estimation of the increase in concentration of adenosine diphosphate in muscle sarcosomes following a contraction.— *Nature*, 1957, vol. 179, p. 1235—1237.
145. *Chance B., Hackett D. P.* The electron transfer system of skunk cabbage mitochondria.— *Plant Physiol.*, 1959, vol. 34, p. 3349.
146. *Chance B., Hess B.* Metabolic control mechanisms. I. Electron transfer in the mammalian cell.— *J. Biol. Chem.*, 1959, vol. 234, p. 2404—2412.
147. *Chance B., Hess B.* Metabolic control mechanisms. II. Crossover phenomena in mitochondria of ascites tumor cells.— *Ibid.*, p. 2413—2415.
148. *Chance B., Hess B.* Metabolic control mechanisms. III. Kinetics of oxygen utilization in ascites tumor cells.— *Ibid.*, p. 2416—2420.
149. *Chance B., Hess B.* Metabolic control mechanisms. IV. The effect of glucose upon the steady state of respiratory enzymes in the ascites cell.— *Ibid.*, p. 2421—2427.
150. *Chance B., Hollunger G.* The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. VI. The efficiency of the reaction.— *J. Biol. Chem.*, 1961, vol. 236, N 5, p. 1577—1584.
151. *Chance B., Mauriello F., Aubert X. M.* ADP arrival at muscle mitochondria following a twitch.— In: Muscle as a tissue / Ed. K. Rodahl. N. Y.; L.: McGraw-Hill, 1962, p. 128—133.
152. *Chance B., Oshino N.* Kinetics and mechanism of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction.— *Biochem. J.*, 1971, vol. 122, p. 225—233.
153. *Chance B., Oshino N., Sugano T.* et al. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals.— In: Oxygen transport to tissue / Ed. H. Bicher. N. Y.; L.: Plenum Press, 1974, vol. 1, p. 277—292.

154. *Chance B., Oshino N., Sugano T.* Role of catalase in ethanol metabolism.— In: Alcohol and aldehyde metabolizing systems / Ed. R. Thurman et al. N. Y.; L.: Acad. Press, 1974, p. 169—182.
155. *Chance B., Quistorff A.* Study of tissue oxygen gradients by single and multiple indicators.— In: Oxygen transport to tissue. III / Ed. T. A. Silver. N. Y.; L.: Plenum Press, 1978, p. 331—338.
156. *Chance B., Saronio C., Leigh Y.* Functional intermediates in reaction of cytochrome oxidase with oxygen.— *J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, p. 9926—9932.
157. *Chance B., Saronio C., Waring A.* et al. Cytochrome c-cytochrome oxidase interaction at subzero temperatures.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, vol. 503, p. 37—55.
158. *Chance B., Schoener B., Krejci R.* Kinetics of fluorescence and metabolite changes in rat liver during a cycle of ischemia.— *Biochem. Ztschr.*, 1965, Bd. 341, S. 325—333.
159. *Chance B., Schoener B., Oshino N.* et al. Oxidation—reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples.— *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, 11, p. 4764—4771.
160. *Chance B., Sies H., Boveris A.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.— *Physiol. Revs.*, 1979, vol. 59, N 3, p. 527—605.
161. *Chance B., Thorell B.* Localization and assay of respiratory enzymes in living cells.— *Nature*, 1959, vol. 184, p. 931—934.
162. *Chance B., Weber A. M.* The steady state of cytochrome b during the rest and after contraction in frog sartorius.— *J. Physiol.*, 1963, vol. 169, p. 263—277.
163. *Chance B., Williams G.* Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. I. Kinetic of Oxygen Utilization.— *J. Biol. Chem.*, 1955, vol. 217, p. 383—393.
164. *Chance B., Williams G. R.* A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation.— *Nature*, 1955, vol. 176, p. 250—255.
165. *Chance B., Williams G. R.* Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state.— *J. Biol. Chem.*, 1955, vol. 217, p. 409—427.
166. *Chance B., Williams G. R.* The respiratory chain and oxidative phosphorylation.— *Adv. Enzymol.*, 1956, vol. 17, p. 65—134.
167. *Chance B., Williams G. R., Gamieson D.* et al. Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide fluorescence of the isolated and in vivo rat heart.— *Biochem. Ztschr.*, 1965, Bd. 341, S. 357—377.
168. *Cinti D. L., Moldeus P., Schenkman J. B.* The role of mitochondria in rat liver mixed function oxidation reactions.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, vol. 47, N 5, p. 1028—1035.
169. *Cinti D. L., Moldeus P., Schenkman J. B.* Kinetic parameters of drug metabolizing enzymes in Cu^{2+} -sedimented microsomes from rat liver.— *Biochem. Pharm.*, 1972, vol. 21, p. 3249—3256.
170. *Cinti D. L., Ritchie A., Schenkman J. B.* Hepatic organelle interaction. II. Effect of tricarboxylic acid cycle intermediates on N-demethylation and hydroxylation reactions in rat liver.— *Mol. Pharmacol.*, 1972, vol. 8, p. 339—344.
171. *Cinti D. L., Schenkman J. B.* Hepatic organelle interaction I. Spectral investigation during drug biotransformation.— *Mol. Pharmacol.*, 1972, vol. 8, p. 327—338.
172. *Clark D. K., Erdmann W., Halsey J. H.* et al. Oxygen diffusion

- conducting and solubility coefficients in the microarea of the brain.—Adv. exp. et med. biol., 1978, vol. 94, p. 697—704.
173. *Clark J. B., Nicklas W. J., Degn H.* The apparent Km for oxygen of rat brain mitochondrial respiration.—J. Neurochem., 1976, vol. 26, p. 409—411.
 174. *Cockrell R. S., Harris E. J., Pressman B. C.* Energetics of potassium transport in mitochondria induced by valinomycin.—Biochemistry, 1966, vol. 5, p. 2326—2335.
 175. *Coburn R. F.* Oxygen tension sensor in vascular smooth muscle.—In: Tissue ischemia and hypoxia /Ed. M. Reivich et al. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977, p. 101—116.
 176. *Cohen B. S., Estabrook R. W.* Microsomal electron transport reactions. II. The use of reduced triphosphopyridine nucleotide and/or reduced diphosphopyridine nucleotide for the oxidative N-demethylation of aminopyrine and other drug substrates.—Arch. Biochem. and Biophys., 1971, vol. 143, p. 46—53.
 177. *Cohen B. S., Estabrook R. W.* Microsomal electron transport reactions. III. Cooperative interactions between reduced diphosphopyridine nucleotide and reduced triphosphopyridine nucleotide linked reactions.—Arch. Biochem. and Biophys., 1971, vol. 143, p. 54—65.
 178. *Cohen G.* A novel route for the metabolism of ethanol: the oxidation of ethanol by hydroxyl free radicals.—In: Alcohol and aldehyde metabolizing system /Ed. R. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1978, vol. 3, p. 335—342.
 179. *Conney A. H.* Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.—Pharmacol. Rev., 1967, vol. 19, p. 317—366.
 180. *Conney A. H., Brown R. R., Müller G. A. et al.* The metabolism of methylated aminoazo dyes. VI. Intracellular distribution and properties of the demethylase system.—Cancer Res., 1957, vol. 17, p. 628—633.
 181. *Conney A. H., Lu Y. H., Ryan D. et al.* Effect of enzyme inducers on substrate specificity of the cytochrome P-450.—Drug Metabol. and Dispos., 1973, vol. 1, p. 199—205.
 182. *Coon M. Y., Ballou D. P., Haugen D. A. et al.* Purification of membrane—bound oxygenases.—In: Microsomes and drug oxidations /Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 82—94.
 183. *Cooper D. V., Narasimhulu S., Rosenthal O. et al.* Spectral and kinetic studies of microsomal pigments.—In: Oxidases and related redox systems /Ed. R. King. N. Y.; L.: J. Wiley and Sons, 1965, p. 838—860.
 184. *Coulter N. A.* Filtration coefficient of capillaries of the brain.—Amer. J. Physiol., 1958, vol. 195, p. 459—464.
 185. *Cronin R. F., Kovač S.* Изв. no [10].
 186. *Crow K. E., Cornell N. W., Veech R. L.* Lactate-stimulated ethanol oxidation in isolated rat hepatocytes.—Biochem. J., 1978, vol. 172, p. 29—36.
 187. *Cummins G. T., Bull R.* Spectrophotometric measurements of metabolic responses in isolated rat brain cortex.—Biochim. et biophys. acta, 1971, vol. 253, p. 29—38.
 188. *Cummins G. T., McIlwain H.* Electrical pulses and the potassium and the other ions of isolated cerebral tissues.—Biochem. J., 1961, vol. 79, p. 330—335.
 189. *Curtis D. R.* Microelectrophoresis.—In: Physical techniques in biological research /Ed. W. L. Nastuk. N. Y.; L.: Acad. press, 1964, vol. 5, pt A, p. 144—190.
 190. *Dallner G., Siekevitz P., Palade G. E.* Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes.—J. Cell Biol., 1966, vol. 30, N 1, p. 73—96.
 191. *Davis E. J., Lumeng L.* Relationships between the phosphorylation potentials generated by Liver mitochondria and respiratory state under conditions of adenosine diphosphate control.—J. Biol. Chem., 1975, vol. 250, p. 2275—2282.
 192. *De Chatelet L. R.* Oxidative bactericidal mechanisms of polymorphonuclear leucocytes.—J. Infect. Diseases, 1975, vol. 131, p. 295—303.
 193. *De Chatelet L. R., Shirley P. S., McPhail L. C. et al.* Oxidative metabolism of the human eosinophil.—Blood, 1977, vol. 50, N 3, p. 525—535.
 194. *De Chatelet L. R., Shirley P. S., McPhail L. C.* Allosteric transformation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (Phosphate) oxidase induced by phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes.—Infect. and Immunol., 1978, vol. 20, N 2, p. 398—405.
 195. *De Duve C.* The separation and characterisation of subcellular particles.—Harvey Lect. Sec., 1965, vol. 59, p. 48—57.
 196. *Degn H., Wohlrab H.* Measurement of steady state values of respiration rate and oxidation levels of respiratory pigments at low Oxygen tension.—Biochim. et biophys. acta, 1971, vol. 245, p. 347—355.
 197. *Dick D. A. T.* The permeability coefficient of Water in the cell membrane and the diffusion coefficient in the cell interior.—J. Theor. Biol., 1964, vol. 7, p. 504—531.
 198. *Dionisi O., Galeotti T., Terranore T. et al.* Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues.—Biochim. et biophys. acta, 1975, vol. 403, p. 292—301.
 199. *Duffy T. E., Nelson S. R., Loury O. H.* Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery.—J. Neurochem., 1972, vol. 19, p. 959—977.
 200. *Dunn W. Y., Hansch C.* Chemicobiological interactions and the use of partition coefficients in their correlation.—Chem. Biol. Interact., 1974, vol. 9, p. 75—95.
 201. *Eaton J. W., Brewer G. J.* The pentose phosphate metabolism.—In: The red blood cell /Ed. M. N. Surgenor. N. Y.; L.: Acad. Press, 1974, vol. 1, p. 435—440.
 202. *Eggleson L. V., Krebs H. A.* Regulation of the pentose phosphate cycle.—Biochem. J., 1974, vol. 138, p. 425—435.
 203. *Elbers R., Heldt H. W., Schmucker P. et al.* Measurement of the ATP/ADP ratio in mitochondria and in the extramitochondrial compartment.—Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 1974, Bd. 355, S. 378—393.
 204. *Elshove A., Van Rossum G. V.* Net movements of sodium and potassium, and their relation to respiration, in slices of rat livers, incubated in vivo.—J. Physiol., 1963, vol. 168, p. 531—537.
 205. *Erecińska M.* A new photoaffinity—labeled derivative of mitochondria cytochrome c.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, vol. 76 (2), p. 495—501.
 206. *Erecińska M., Davis J. S., Wilson D. F.* Regulation of respiration

- In *Paracoccus denitrificans*: The dependence on redox state of cytochrome c and [ATP]/[ADP] [Pi].—Arch. Biochem. and Biophys., 1979, vol. 197 (2), p. 463—469.
207. *Erecińska M., Kula T., Wilson D. F.* Regulation of energy metabolism: Evidence against a primary role of adenine nucleotide translocase.—FEBS Lett., 1978, vol. 87, p. 139—144.
 208. *Erecińska M., Stubbs M., Miyata Y.* et al. Regulation of metabolism by intracellular phosphate.—Biochim. et biophys. acta, 1977, vol. 462, p. 20—35.
 209. *Erecińska M., Veech R. L., Wilson D. F.* Thermodynamic relationships between the oxidation—reduction reactions and the ATP synthesis in suspensions of isolated pigeon heart mitochondria.—Arch. Biochem. and Biophys., 1974, vol. 160, p. 412—421.
 210. *Erecińska M., Wilson D. F.* Cytochrome c oxidase: A synopsis.—Arch. Biochem. and Biophys., 1978, vol. 188 (1), p. 1—14.
 211. *Erecińska M., Wilson D. F.* The effect of antimycin A on cytochrome b561, b566 and their relationship to ubiquinone and the iron-sulfur centers $S=1(+N-2)$ and $S=3$.—Arch. Biochem. and Biophys., 1976, vol. 174, p. 143—153.
 212. *Erecińska M., Wilson D.* On the mechanism of regulation of cellular respiration: The dependence of respiration on the cytosolic concentration ATP, ADP, P_i .—Adv. exp. med. et biol., 1978, vol. 94, p. 271—278.
 213. *Erecińska M., Wilson D. F., Blasie Y. K.* Studies on the orientations of the mitochondrial redox carriers.—Biochim. et biophys. acta, 1978, vol. 501, p. 53—62.
 214. *Erecińska M., Wilson D., Nishiki K.* Homeostatic regulation of cellular energy metabolism experimental characterization in vivo and fit to a model.—Amer. J. Physiol., 1978, vol. 234, 3, p. 82.
 215. *Eriksson C. J. P.* Ethanol and acetaldehyde metabolism in rat strains genetically selected for their ethanol preference.—Biochem. Pharm., 1973, vol. 22, p. 2283—2292.
 216. *Eriksson C. J. P., Lindros R. O., Forsander O. A.* 2,4-Dinitrophenol—induced increase in ethanol and acetaldehyde oxidation in the perfused rat liver.—Biochem. Pharm., 1974, vol. 23, p. 2193—2195.
 217. *Eriksson C. J. P., Sippel H. W.* The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation.—Biochem. Pharm., 1977, vol. 26, N 3, p. 241—247.
 218. *Ernster L., Luft R.* Mitochondrial respiratory control: biochemical physiological and pathological aspects.—In: Advances in metabolic disorders /Ed. R. Levine et al. N. Y.; L.: Acad. Press, 1964, vol. 1, p. 95—123.
 219. *Ernster L., Orrenius S.* Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes.—Fed. Proc., 1965, vol. 24, N 5, p. 1190—1199.
 220. *Estabrook R. W.* Cytochrome P-450, its function in the oxidative metabolism of drugs.—In: Handbook of experimental pharmacology /Ed. B. B. Brodie et al. B.: Springer—Verl., 1971, vol. 28, pt 2, p. 264—284.
 221. *Estabrook R. W., Franklin M., Baron I.* et al. Properties of the membrane-bound electron transfer complex of the hepatic endoplasmic reticulum associated with drug metabolism.—In: Drugs and cell regulation /Ed. E. Minich. N. Y.: Acad. Press, 1971, p. 227—257.
 222. *Estabrook R. W., Werringloer Y.* The oxygen sensing characteristics of microsomal enzyme.—In: Tissue ischemia and hypoxia /Ed. M. Reivich et al. N. P.: L.: Plenum Press, 1977, p. 19—35.
 223. *Estabrook R. W., Werringloer Y.* Active oxygen—fact or fancy.—In: Microsomes and drug oxidations /Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 748—757.
 224. *Eyer P., Hertle H., Kiese M. T.* et al. Kinetics of ferrihemoglobin formation by some reducing agents and the role of hydrogen peroxide.—Mol. Pharmacol., 1975, vol. 11, p. 326—334.
 225. *Fabel H., Lübbers D. W.* Measurements of reflection spectra of the beating heart in situ.—Biochem. Ztschr., 1965, Bd. 341, S. 351—356.
 226. *Farber E.* ATP and cell integrity.—Fed. Proc., 1973, vol. 32, p. 1534—1539.
 227. *Fay F. S., Nair P., Whalen W. J.* Mechanism of Oxygen induced contraction of ductus arteriosus.—In: Tissue hypoxia and ischemia /Ed. M. Reivich. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977, p. 123—134.
 228. *Fischkoff S., Vandekosi I. M.* Oxygen diffusion in biological and artificial membrane determined by the fluorochrome pyrene.—J. Gen. Physiol., 1975, vol. 65, p. 663—676.
 229. *Fisher A., Huber G., Furia L.* Cytochrome P-450 content and mixed—function oxidation by microsomes from rabbit alveolar macrophages.—J. Lab. and Clin. Med., 1977, vol. 90, p. 101—108.
 230. *Fisher D. B., Kaufman S.* The inhibition of phenylalanine and tyrosine hydroxylases by high oxygen levels.—J. Neurochem., 1972, vol. 19, p. 1359—1365.
 231. *Flohe L., Schlegel W.* Glutathion—peroxidase. IV. Intrazelluläre Verteilung des Glutathion—Peroxidase—Systems in der Rattenleber.—Hoppe-Seyler's Ztschr. Phys. Chem., 1971, Bd. 352, S. 1401—1410.
 232. *Foerder C. A. S., Klebanoff S. Y., Shapiro B. M.* Hydrogen peroxide production, chemiluminescence and the respiratory burst of fertilization.—Proc. Nat. Acad. Sci., 1978, vol. 75, p. 3183—3189.
 233. *Foerder C. A. S., Shapiro B. M.* Release of peroxidase from sea urchin eggs hargens the fertilization membrane with tyrosine cross-links.—Proc. Nat. Acad. Sci., 1978, vol. 74, p. 4214—4217.
 234. *Forman H. J., Kennedy Y.* Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, vol. 60, p. 1044—1050.
 235. *Forsander O. A.* Influence of ethanol on the redox states of the liver.—Quart. J. Stud. Alcohol, 1970, vol. 31, p. 550—570.
 236. *Freese E., Freese E. B.* The oxygen of deoxyribonucleic acid inactivation by hydroxylamines.—Biochemistry, 1965, vol. 4, p. 2419—2433.
 237. *Freese E. B., Gerson I., Taber H.* et al. Inactivating DNA alterations induced by peroxides and peroxide producing agents.—Mutat. Res., 1967, vol. 4, p. 517—531.
 238. *Fridovich I.* Superoxide dismutase.—Adv. Enzymol., 1974, vol. 41, p. 35—97.
 239. *Fridovich I.* Superoxide dismutases.—Annu. Rev. Biochem., 1975, vol. 44, p. 147—159.
 240. *Franke W. W., Morré D. J., Deumling B.* et al. Synthesis and turnover of membrane proteins in rat liver: An examination of the membrane flow hypothesis.—Ztschr. Naturforsch., 1971, Bd. 26b, S. 1031—1039.

241. *Fry I. R., Bridges J. W.* The metabolism of xenobiotics in cell suspensions and cell cultures.— In: Progress in drug metabolism/Ed. J. W. Bridges et al. L.: J. Wiley and Sons, 1977, vol. 2, p. 71—118.
242. *Ganfeld R., Hair P., Whalen W.* Mass transfer, storage, and utilization of O₂ in cat cerebral cortex.— Amer. J. Physiol., 1970, vol. 219, N 3, p. 814—821.
243. *Gayeski E. J., Honig C. R.* Myoglobin saturation and calculated pO₂ in single cells of resting gracilis muscles.— In: Oxygen transport to tissue. III./Ed. G. A. Silver. N. Y.: Plenum Press, 1978, p. 335—342.
244. *Gee J. B. L., Vasallo C. L., Bell P.* et al. Catalase — dependent peroxidative metabolism in alveolar macrophage during phagocytosis.— J. Clin. Invest., 1970, vol. 49, p. 1280—1287.
245. *Gerschman R.* Biological effects of oxygen.— In: Oxygen in the animal organism/Ed. F. Dickens et al. L.: Pergamon Press, 1964, p. 475—494.
246. *Gerschman R. D., Gibert D. L., Nye S. W.* et al. Oxygen poisoning and x — irradiation: A mechanism in common.— Science, 1954, vol. 119, p. 623—626.
247. *Gillette J. R.* Factors affecting drug metabolism.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1971, vol. 179, p. 43—66.
248. *Gillette J. R., Brodie B. B., Ladu B.* The oxidation of drugs by liver microsomes: On the role of TPNH and oxygen.— J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1957, vol. 119, p. 532—543.
249. *Gillette J. R., Stripp B.* Pre- and postnatal enzyme capacity for drug metabolite production.— Fed. Proc., 1975, vol. 34, N 2, p. 172—178.
250. *Gillette J. R., Stripp B., Zampaglione N.* et al. Studies of the stoichiometric relationships between the oxidation of drugs and the oxidation of reduced pyridine nucleotides by liver microsomal enzymes.— Chemico-Biol. Inter., 1971, vol. 3, p. 266—267.
251. *Gnosspeilus Y., Thor H., Orrenius S. A.* Comparative study on the effects of phenobarbital and 3,4-Benzpyrene on the hydroxylating enzyme system of rat-liver microsomes.— Chem. Biol. Intertact., 1969—70, vol. 1, p. 125—137.
252. *Goldstick T. K.* Oxygen autoregulation in skeletal muscle.— In: Oxygen transport to tissue/Ed. H. Bicher. et al. N. Y.: Plenum Press, 1974, vol. 1, p. 444—450.
253. *Graham L., Lukjanova L., Siesjo B. K.* The effect of masked hyperventilation upon tissue levels of NADH, lactate, pyruvate, phosphocreatine and adenosine phosphates of rat brain.— Acta physiol. scand., 1969, vol. 77, p. 179—190.
254. *Grasety D. R., Murrey J. F.* Effect of 2,2-dithiodipiridine on thiols and oxidable substrates of Ehrlich ascite tumor cells and normal mouse tissue.— Biochem. Pharm., 1967, vol. 16, p. 2387—2393.
255. *Green R. C., O'Brien P. J.* The Cellular location of glutathione peroxidase and its release from mitochondria during swelling.— Biochim. et biophys. acta, 1970, vol. 197, p. 31—39.
256. *Greengard P., Minnaert K., Slater E. C.* et al. Yield of Oxidative phosphorylation associated with the oxidation of succinate to fumarate.— J. Biol. Chem., 1959, vol. 73, p. 637—646.
257. *Greven R.* Der O₂ — Diffusionskoeffizient von Leber, Nierenrinde und Hirnrinde unter verschiedenen Bedingungen.— Pflügers Arch., 1960, Bd. 271, S. 14—22.
258. *Grundin R.* Metabolic interaction of ethanol and alprenolol in isolated liver cells.— Acta pharmacol. et toxicol., 1975, vol. 37, p. 185—200.
259. *Grundin R., Moldeus P., Orrenius S.* et al. The possible role of cytochrome P-450 in the liver «first pass elimination» of a β -receptor blocking drug.— Acta pharmacol. et toxicol., 1974, vol. 35, p. 242—260.
260. *Grundin R., Moldeus P., Vadi H.* Drug metabolism in isolated rat liver cells.— Adv. Exp. med. Biol., 1975, vol. 58, p. 251—269.
261. *Grundin R., Thor H., Orrenius S.* The inhibition of the mitochondrial NADH oxidase by alprenolol and the protective effect of cytochrome P-450.— Acta pharmacol. et toxicol., 1975, vol. 37, p. 154—164.
262. *Grunewald W. A., Lubbers D. W.* Kryomicrophotometry as a method for analysing the intracapillary HbO₂ saturation of organ under different O₂ supply conditions.— In: Oxygen transport to tissue. II/Ed. J. Grote et al. N. Y.; L.: 1976, p. 75—82.
263. *Grunewald W. A., Sava W.* Distribution of intracapillary O₂-supply and tissue pO₂ in canine left ventricular during normoxia.— In: Oxygen transport to tissue. III/Ed. I. A. Silver. N. Y.; L.: Plenum Press, 1978, p. 205—212.
- 263a. *Halliwell B.* Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates.— FEBS Lett., 1978, vol. 92, p. 321—326.
264. *Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B.* Prostaglandin endoperoxides: A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1974, vol. 71, p. 3824—3828.
265. *Hansch C.* Quantitative relationships between lipophilic character and drug metabolism.— Drug Metabol. Rev., 1972, vol. 1, p. 1—14.
266. *Hassinen L. E., Hiltunen K.* Respiratory control in isolated perfused rat heart.— Biochim. et biophys. acta, 1975, vol. 408, p. 319—330.
267. *Hasumura Y., Teschke R., Lieber C. S.* Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria.— J. Biol. Chem., 1976, vol. 251, N 16, p. 4908—4913.
268. *Held H. W., Klingenberg M., Milovancev M.* Difference between the ATP/ADP ratios in the mitochondrial matrix and in the extra — mitochondrial space.— Europ. J. Biochem., 1972, vol. 30, p. 434—440.
269. *Hemmerich P., Nageleschneider G., Veeger C.* Chemistry and Molecular biology of flavins and flavoproteins.— FEBS Lett., 1970, vol. 8, p. 69—83.
270. *Hempel F. G., Jöbsis F. F., Manna Y. L.* et al. Oxidation of cerebral cytochrome AA₃ by oxygen plus CO at hyperbaric pressures.— J. Appl. Physiol., 1977, vol. 43, p. 873—879.
271. *Hensgens L. A., Nieuwenhuis B. J., van der Meer R.* et al. The role of hydrogen translocating shuttles during ethanol oxidation in hepatocytes from euthyroid and hyperthyroid rats.— Europ. J. Biochem., 1980, vol. 108, p. 39—45.
272. *Hernandez-Munoz R., Santamaria A., Garcia-Sainz J. A.* et al. On the mechanism of ethanol — induced fatty liver and its reversibility by adenosine.— Arch. Biochem. and Biophys., 1978, vol. 190, p. 155—162.

273. *Hersey S. Y.* Interactions between oxidative metabolism and acid secretion in gastric mucosa.— *Biochim. et biophys. acta*, 1974, vol. 344, p. 157—203.
274. *Hersey S. Y., Jöbsis F.* Redox changes in the respiratory chain related to acid secretion by the intact gastric mucosa.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1969, vol. 36, p. 243—250.
275. *Hess B., Chance B.* Phosphorylation efficiency of the intact cell. I. Glucose-oxygen titrations in ascites tumor cells.— *J. Biol. Chem.*, 1959, vol. 234, N 11, p. 3031—3035.
276. *Hewitt L. F.* Oxidation — reduction potentials in bacteriology and biochemistry. Edinburg: Livingstone, 1950. 215 p.
277. *Higashi T., Peters T.* Studies on rat liver catalase.— *J. Biol. Chem.*, 1963, vol. 238, p. 3945—3951.
278. *Higgins C. P., Baehner R. L., McCallister J. et al.* Polymorphonuclear leukocyte species difference in the disposal of hydrogen peroxide.— *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1978, vol. 158, p. 478—481.
279. *Hilderbrandt A. G.* The binding of metyrapone to cytochrome P-450 and its inhibitory action on microsomal hepatic mixed function oxidation reactions.— In: *Biological hydroxylation mechanisms* / Ed. G. S. Boyd et al. L.; N. Y.: Acad. Press, 1972, p. 79.
280. *Hilderbrandt A. G., Estabrook R. W.* Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed — function oxidation reactions.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1971, vol. 143, p. 66—79.
281. *Hilderbrandt A. G., Roots J.* Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation in liver microsomes.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1975, vol. 171, p. 385—397.
282. *Hill A. V.* Trails and trials in physiology. L.: Arnold, 1965. 374 p.
283. *Hinkle P. C., Butow R. A., Racker E. et al.* Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.— *J. Biol. Chem.*, 1967, vol. 242, p. 5169—5173.
284. *Hochstein P., Ernster L.* ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1963, vol. 12, p. 388—394.
285. *Hoek J. B., Ernster L.* Mitochondrial transhydrogenase and the regulation of cytosolic reducing power.— In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 351—364.
286. *Hodgkin A. L., Keynes R. D.* Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo.— *J. Physiol.*, 1955, vol. 128, p. 28—33.
287. *Högberg J., Moldeus P., Arborgh B. et al.* The consequences of lipid peroxidation in isolated hepatocytes.— *Europ. J. Biochem.*, 1975, vol. 59, p. 457—462.
288. *Högberg J., Orrenius S., O'Brien P. J.* Further studies on lipid — peroxide formation in isolated hepatocytes.— *Europ. J. Biochem.*, 1975, vol. 59, p. 449—455.
289. *Hokin L. E.* The sodium — potassium adenosinetriphosphatase.— *Metabol. Transp.*, 1972, vol. 6, p. 270—317.
290. *Holian A., Wilson D. F.* Relationship of transmembrane pH and electrical gradients with respiration and adenosine 5'-triphosphate synthesis in mitochondria.— *Biochemistry*, 1980, vol. 19, p. 4213—4221.

291. *Holian A., Owen Ch. S., Wilson D. F.* Control of respiration in isolated mitochondria: Quantitative evaluation of the dependence of respiratory rates on [ATP], [ADP] and [Pi].— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1972, vol. 181, p. 164—171.
292. *Hook G., Bend Y. R., Fouts J. B.* Mixed function Oxidases and the alveolar macrophage.— *Biochem. Pharm.*, 1972, vol. 21, p. 3267—3277.
- 292a. *Hortia A.* Comparative pharmacology of hydrazine analogues clinically useful as monoamine oxidase inhibitors.— *Clin. Med.*, 1959, vol. 80, p. 590—595.
293. *Horne D. W., Briggs W. T., Wagner C.* A functional active transport system for methotrexate in freshly isolated hepatocytes.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, vol. 68, N 1, p. 70—76.
294. *Horton A. A., Barrett M. C.* The subcellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1975, vol. 167, p. 426—436.
295. *Hunter Y., Chasseaud L. F.* Clinical aspects of microsomal enzymes induction.— In: *Progress in drug metabolism* / Ed. I. W. Bridges et al. L.: John Wiley and Sons, 1977, vol. 1, p. 129—134.
296. *Ingelman-Sundberg M.* Protein-lipid interactions in the liver microsomal hydroxylase system.— In: *Microsomes and drug oxidations* / Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 67—75.
297. *Ishihara A., Tanika H., Takeda J.* Respiratory control of dispersed rat-liver cells.— *Biochim. et biophys. acta*, 1965, vol. 97, p. 1—15.
298. *Isono N., Yasumasu J.* Pathways of carbohydrate breakdown in sea Urechis eggs.— *Exp. Cell Res.*, 1968, vol. 50, p. 616—620.
- 298a. *Israel I., Kalant H., Khanna J. et al.* Ethanol metabolism, oxygen availability and alcoholinducting damage.— In: *Alcohol intoxication and withdrawal-IIIa* / Ed. M. Gross. N. Y.; Y.: Plenum Press, 1977, p. 343—358.
299. *Iyanagi I., Masan H. S.* Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate — cytochrome C reductase.— *Biochemistry*, 1973, vol. 12, 12, p. 2297—2308.
300. *Iyer G., Islam D. M. F.* Biochemical aspects of photocytosis.— *Nature*, 1961, vol. 192, p. 535—541.
301. *Iyer G. Y., Quastel J. H.* NADPH and NADH oxidation by guinea pig polymorphonuclear leukocytes.— *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 1967, vol. 41, p. 427—434.
302. *Jallino O., Lindberg O., Ernster L.* On the effect of substituted barbiturates on mitochondrial respiration.— *Acta chem. scand.*, 1955, vol. 9, p. 198—199.
303. *Jang C. S.* Interaction between cytochrome P-450 and NADPH — cytochrome P-450 reductase in the microsomal membrane.— In: *Microsomes and drug oxidations* / Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 9—16.
304. *Jansson I., Schenkman J. B.* Evidence against participation of cytochrome b_5 in the hepatic microsomal mixed — function oxidase reaction.— *Mol. Pharm.*, 1973, vol. 9, p. 840—845.
305. *Jansson J., Schenkman J. B.* Studies on three microsomal electron transfer enzymes systems.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, vol. 178, p. 89—107.
306. *Jensen P. K.* Antimycin-insensitive oxidation of succinate and

- reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles.— *Biochim. et biophys. acta*, 1966, vol. 122, p. 157—166.
307. *Jöbsis F. F.* Spectrophotometric studies on intact muscle.— *J. Gen. Physiol.*, 1963a, vol. 46, p. 905—928.
 308. *Jöbsis F. F.* Spectrophotometric studies on intact muscle.— *J. Gen. Physiol.*, 1963b, vol. 46, p. 926—969.
 309. *Jöbsis F. F.* What is a molecular sensor?— In: *Tissue hypoxia and ischemia* / Ed. M. Reivich etc. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977, p. 3—48.
 310. *Jöbsis F. F., Duffield Y. G.* Oxidative and glycolytic recovery metabolism in muscle.— *J. Gen. Physiol.*, 1967, vol. 50, p. 1009—1047.
 311. *Jöbsis F. F., Keizer J. H., La Manna Y. C.* et al. Reflectance spectrophotometry of cytochrome AA₃ in vivo.— *J. Appl. Physiol.*, 1977, vol. 43, p. 858—877.
 312. *Jöbsis F. F., Rosenthal M.* Behaviour of the mitochondrial respiratory chain in vivo.— In: *Ciba Foundation Symp.* 56. Amsterdam etc.: Elsevier — *Excerpta Medica* — North-Holland, 1978, p. 149—167.
 313. *Jöbsis F. F., Rosenthal M.* Cerebral energy consumption and provision: the predominance of neuronal oxidative metabolic processes.— In: *The same place*, p. 129—144.
 314. *Jöbsis F. F., Stainsby W. N.* Oxidation of NADH during contractions of circulated mammalian skeletal muscle.— *Respirat. Physiol.*, 1968, vol. 4, p. 292—300.
 315. *Johnson D. A., Lee N. M., Cooke R.* et al. Adaptation of ethanol-induced fluidization of brain lipid bilayers: Cross-tolerance and reversibility.— *Mol. Pharm.*, 1980, vol. 17, p. 52—55.
 - 315a. *Johnson R. B.* Oxygen metabolism and microbicidal activity of macrophages.— *J. Exp. Med.*, 1978, vol. 148, p. 115—127.
 316. *Jones D. P., Mason H. S.* Gradients of O₂ concentration in Hepatocytes.— *J. Biol. Chem.*, 1978, vol. 253, p. 4874—4880.
 317. *Junge O., Brand K.* Mixed function oxidation of hexobarbital and generation of NADPH by the hexose monophosphate shunt in isolated rat liver cells.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1975, vol. 171, p. 398—406.
 318. *Kahl R., Buecker M., Netter K. Y.* Sex differences in the patterns of cytochromes P-450 in rat liver microsomes.— In: *Microsomes and drug oxidation* / Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Plenum Press, 1977, p. 177—184.
 319. *Kakinuma A., Boveris A., Chance B.* H₂O₂ Generation in subcellular fractions of leukocytes assayed by cytochrome C peroxidase method.— *FEBS Lett.*, 1977, vol. 74, p. 295—299.
 320. *Kakinuma A., Chance B.* Spectrophotometric studies on NADPH oxidase of leukocytes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, vol. 480, p. 98—103.
 321. *Kamino K., Inouye A.* Light-scattering studies on rabbit brain microsomes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1970, vol. 205, p. 246—253.
 322. *Karnovsky M. L.* The metabolism of leukocytes.— *Sem. Hematol.*, 1968, vol. 5, p. 156—165.
 323. *Katz J. Y.* An electrolytic method for controlling oxidation-reduction potentials and its application on the study of anaerobiosis.— *Arch. Biochem.*, 1943, vol. 2, 2, p. 183—200.
 324. *Kaufman S.* [Ит. no [173].
 325. *Keilin D.* On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants.— *Proc. Roy. Soc. London B*, 1925, vol. 98, p. 312—333.
 326. *Keilin D.* Cytochrome and respiratory enzymes.— *Proc. Roy. Soc. London B*, 1929, vol. 104, p. 206—252.
 327. *Keilin D.* The history of cell respiration and cytochrome. Cambridge: Univ. Press, 1966. 300 p.
 328. *Keilin D., Hartree E.* Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohol.— *Biochem. J.*, 1945, vol. 39, p. 203—301.
 329. *Kessler M.* Normal and critical O₂—supply of the liver.— In: *Oxygen transport of blood and tissue* / Ed. N. Oshino. N. Y.: Plenum Press, 1968, p. 242—250.
 330. *Kessler M., Grunewald N.* Possibilities of measuring oxygen pressure in human muscle.— In: *Oxygen pressure records in gases, fluids and tissues* / Ed. F. Kreuzer. Basel: Karger, 1969, p. 147—157.
 331. *Khanna J., Kalant H.* Effect of inhibitors and inducers of drug metabolism on in vivo ethanol metabolism.— *Biochem. Pharm.*, 1970, vol. 19, p. 2033—2041.
 - 331a. *Khamna J., Kalant H.* In vivo significance of the microsomal ethanol oxidizing system.— In: *Alcohol intoxication and withdrawal* — IIIa / Ed. M. Gross. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977, p. 281—302.
 332. *Kilpatrick L., Erecińska M.* Mitochondrial respiratory chain of tetrahymena pyriformis.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, vol. 460, p. 346—363.
 333. *Klebanoff S. J., Foerder C. A., Eddy E. M.* Metabolic similarities between fertilization and phagocytosis. Conservation of a peroxidic mechanism.— *J. Exp. Med.*, 1979, vol. 149, p. 938—953.
 334. *Klebanoff S. Y., Pincus S. H.* Hydrogen peroxide utilization in myeloperoxidase—deficient leukocytes: A possible microbicidal control mechanism.— *J. Clin. Invest.*, 1971, vol. 50, p. 2226—2229.
 335. *Klingenberg M.* Reversibilität der energiem Wandlungen in der Atmungskette.— *Angew. Chem.*, 1963, Bd. 75, S. 900—907.
 336. *Klingenberg M.* Interaction of the ADP, ATP transport with the system of oxydative phosphorylation.— In: *Structure and function of energy transducing membranes* / Ed. K. Van Dam et al. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. Co., 1977, p. 275—282.
 337. *Klingenberg M., Schollmeyer P.* Zur Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung.— *Biochem. Ztschr.*, 1960, Bd. 333, S. 335—341.
 338. *Klingenberg M., Schollmeyer P.* Zur Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung.— *Biochem. Ztschr.*, 1961, Bd. 335, S. 243—262.
 339. *Kohen E., Kohen C.* A study of mitochondrial extramitochondrial interactions in giant tissue culture cells by microfluorometry—microelectrophoresis.— *Gistochemie*, 1966, vol. 7, p. 339—350.
 340. *Kohen E., Kohen C., Tenkins W.* The influence of microelectrophoretically introduced metabolites on pyridine nucleotide reduction in giant tissue culture ascites cells.— *Exp. Cell Res.*, 1966, vol. 44, p. 175—194.
 341. *Kohen E., Kohen C., Thorell B.* Analysis of metabolic transients in intact cells by rapid microfluorimetry.— *Microchim. acta*, 1972a, vol. 37, p. 103—108.
 342. *Kohen E., Kohen C., Thorell B.* Rapid two-canal microfluorimetry.— *Biochim. et biophys. acta*, 1972b, vol. 286, p. 186—194.
 343. *Kong M. S., Landau B.* Compartmentation of NADPH in rat liver.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, vol. 180, p. 69—74.

344. Kong S., Davison A. J. The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$, e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems.— Arch. Biochem. and Biophys., 1980, vol. 204, p. 18—29.
345. Krebs H. A., Veech R. L.— In: The energy level and metabolic control in mitochondria / Ed. S. Papa et al. Bari Itali: Adriatic editrice, 1969, p. 329—382 (Ist. no [597]).
346. Krogh A. The number and distribution of capillaries in muscles with calculation of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue.— J. Physiol., 1919, vol. 52, p. 408—445.
347. Kuster V., Bohnensack R., Kunz W. Control of oxidative phosphorylation by the extramitochondrial ATP/ADP ratio.— Biochim. et biophys. acta, 1976, vol. 440, p. 391—402.
348. Lahiri S. Oxygen linked response of carotid chemoreceptors.— In: Tissue hypoxia and ischemia / Ed. M. Reivich. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977, p. 185—202.
349. La Manna J. C., Cordingley G., Rosenthal M. Phenobarbital actions in vivo: Effects on extracellular potassium activity and oxidative metabolism in cat cerebral cortex.— J. Pharm. and Exp. Ther., 1977, vol. 200, p. 560—569.
350. La Manna J. C., Rosenthal M. Effect of ouabain and phenobarbital on oxidative metabolic activity associated with spreading depression in cats.— Brain Res., 1975, vol. 88, p. 145—149.
351. La Manna J. C., Sylvia A. L., Martel D. et al. Fluorometric monitoring of the effects of adrenergic agents on oxidative metabolism in intact cerebral cortex.— Neuropharmacology, 1976, vol. 15, p. 17—24.
352. Lardy H. A. Energetic coupling and regulation of metabolic rates.— In: Congr. Intern. Biochem. Brussels, 1955, p. 287—293.
353. Lavelle F., Michelson A. M., Dimitrijevic L. Biological protection by superoxide dismutase.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, vol. 55, p. 350—357.
354. Lawrence R. A., Burk R. F. Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity.— J. Nutr., 1978, vol. 108, p. 211—215.
355. Lazarow P. B., DeDuve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, vol. 73, p. 2043—2046.
356. Leikman K. C., Anaclerio A. M. Comparative studies on sulphanilamide acetylation: An inhibitor in dog liver.— Biochem. Pharm., 1961, vol. 8, p. 47—51.
357. Laties G. G. Controlling influence of thickness on development and type of respiratory activity in potato slices.— Plant Physiol., 1962, vol. 37, N 5, p. 679—683.
358. Levin W., Lu A. J. H. et al. Lipid peroxidation and degradation of cytochrome P-450 heme.— Arch. Biochem. and Biophys., 1973, vol. 154, p. 842—846.
359. Lieber C. S., DeCarli L. Ethanol oxidation by hepatic microsomes.— Science, 1968, vol. 162, p. 917—918.
360. Lieber C. S., Rubin E., De Carli L. M. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): Differentiation from alcohol dehydrogenase and NADPH oxidase.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1970, vol. 40, N 4, p. 858—865.
361. Lin D. C. Involvement of the lipid and protein components of $(Na^+ + K^+)$ — adenosine triphosphatase in the inhibitory action of alcohol.— Biochem. pharm., 1980, vol. 29, p. 771—775.
362. Lindros K. O., Vihma R., Forsander O. A. Utilization and metabolic effects of acetaldehyde and ethanol in the perfused rat liver.— Biochem. J., 1972, vol. 126, p. 945—952.
363. Lindsay J. G., Owen C. S., Wilson D. F. The invisible copper of cytochrome with oxidase.— Arch. Biochem. and Biophys., 1975, vol. 169, p. 492—505.
364. Lipton P. Effects of membrane depolarisation on nicotinamide nucleotide fluorescence in brain slices.— Biochem. J., 1973, vol. 136, p. 999—1009.
365. Lloyd D., Edwards S. W. Electron transport pathways alternative to the main phosphorylating respiratory chain.— In: Functions of alternative terminal oxidases / Ed. H. Degen et al. Oxford: Pergamon Press, 1978, p. 1—10.
366. Longmuir I. S. Respiration rate of rat-liver cells at low oxygen concentration.— Biochem. J., 1957, vol. 65, p. 378—383.
367. Longmuir I. S. Tissue respiration.— In: Advances in respiratory physiology / Ed. G. Caro. L.: Arnold, 1966, p. 18—25.
368. Longmuir I. S., Jong A., Mailman R. Induction by hypoxia of a new haemoglobin-line pigment.— Adv. exp. med. et biol., 1978, vol. 94, p. 297—300.
369. Longmuir I. S., Knopp J. A., Lee T. P. et al. The intracellular heterogeneity of oxygen concentrations as measured by ultraviolet television microscopy of PBA fluorescence quenching by oxygen.— Adv. exp. med. et biol., 1978, vol. 94, p. 93—98.
370. Longmuir I. S., Pashko L. The role of facilitated diffusion of oxygen in tissue hypoxia.— Intern. J. Biomed., 1977, vol. 21, N 2, p. 179—187.
371. Loschen G., Azzi A., Flohe L. Mitochondrial hydrogen peroxide formation.— In: Alcohol and aldehyde metabolizing systems / Ed. R. G. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 215—229.
372. Loschen G., Azzi A., Flohe L. Mitochondrial H_2O_2 formation: relationship with energy conservation.— FEBS Lett., 1973, vol. 33, p. 84—88.
373. Loschen G., Azzi A., Richter C. et al. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide.— FEBS Lett., 1974, vol. 42, p. 68—72.
374. Loschen G., Flohe L., Chance B. Respiratory chain linked H_2O_2 production in pigeon heart mitochondria.— FEBS Lett., 1974, vol. 18, p. 261—264.
375. Lothman E., La Manna J. C., Cordingley G. et al. Responses of electrical potential, potassium levels and oxidative metabolic activity of the cerebral neocortex of cats.— Brain Res., 1975, vol. 88, p. 15—36.
376. Lu A. Y. H., West S. B., Vore M. et al. Role of cytochrome b_5 in hydroxylation by a reconstituted cytochrome P-450 — containing system.— J. Biol. Chem., 1974, vol. 249, N 24, p. 6701—6709.
377. Lübbbers D. W., Jobsis F. F. Myoglobin dioxygenation in relation to muscular activity.— J. Cell and Comp. Physiol., 1957, vol. 50, p. 351—356.
378. Lübbbers D. W., Kessler M. Oxygen supply and rate of tissue respiration.— In: Oxygen transport in blood and tissue / Ed. D. W. Lübbbers et al. Stuttgart: Geop. Thieme, 1968, p. 90—91.
379. Lübbbers D. W., Leniger-Follert E. Capillary flow in the brain cortex during changes in oxygen supply and state of activation.—

- In: Ciba Foundation Symp. 56. North Holland Amsterdam: Elsevier — Excerpta medica, 1978, p. 21—48.
380. *Lübbbers D. W., Wodick R.* The examination of multicomponent systems in biological materials by means of a rapid scanning photometer.— *Appl. Opt.*, 1969, vol. 8, p. 1055—1062.
 381. *Lukjanova L., Bures I.* Changes in pO_2 due to spreading depression of the rat.— *Physiol. bohemosl.*, 1967, sv. 16, s. 449—454.
 382. *Lumper L., Plock H. J., Staudinger H.* Untersuchungen zur Abhängigkeit der Lipidperoxydation in Rattenlebermikrosomen vom Sauerstoffpartialdruck.— *Hoppe Seyler's Ztschr. phys. Chem.*, 1968, Bd. 349, S. 1185—1190.
 383. *Lundquist F., Damgaard S. E.* Interrelation between the pathways of fructose and ethanol carbon metabolism in perfused pig and rat liver.— In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. G. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 405—446.
 384. *Mandel I. J., Moffet D. F., Jöbsis F. F.* Redox state of respiratory chain enzymes and potassium transport in silkworm mid-gut.— *Biochim. et biophys. acta*, 1975, vol. 408, p. 123—134.
 385. *Mannering G. J., Van Harken D. R., Makar A. B.* et al. Role of intracellular distribution of hepatic catalase in the peroxidative oxidation of methanol.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1968, vol. 168, p. 265—280.
 386. *Massey V., Strickland S., Mayhew S. G.* et al. The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1969, vol. 36, p. 891—897.
 387. *Mastars B., Schacter B. A.* The catalysis of Heme degradation by purified NADPH-cytochrome C reductase in the absence of other microsomal proteins.— *Ann. Clin. Res.*, 1976, vol. 8, suppl. 17, p. 18—27.
 388. *Mastars C., Holmes R.* Peroxisomes: New aspects of cell physiology and biochemistry.— *Phys. Rev.*, 1977, vol. 57, p. 816—882.
 389. *Matsubara T., Tochino Y.* Electron transport systems of lung microsomes and their physiological functions.— *J. Biochem.*, 1971, vol. 70, p. 981—991.
 390. *Matsuzaki S., Teschke R., Ohnishi K.* et al. Acceleration of ethanol metabolism by high ethanol concentrations and chronic ethanol consumption.— In: *Alcohol and the liver* / Ed. M. Fisher et al. N. Y.: Plenum Press, 1977, p. 119—144.
 391. *Mayevsky A., Bar-Sagie D.* The interrelation between CBF, energy metabolism and $EcoY$ in a new awake brain model.— In: *Oxygen transport to tissue-III* / Ed. I. A. Silver. N. Y.: L.: Plenum Press, 1978, p. 761—768.
 392. *McCord J. M., Kelle B. B., Fridovich I.* An enzyme based theory of obligatory anaerobiosis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, vol. 68, p. 1024—1027.
 393. *McIlwain H.* Membrane function in preparations from the mammalian brain.— *Biochem. Brit. Med. Bull.*, 1968, vol. 24, p. 174—179.
 394. *McIlwain H., Bachelard H. S.* Biochemistry and the central nervous system. L.: Churchill-Livingstone, 1971, p. 280.
 395. *McKerns K. W.* Mechanisms of ACTH regulation of the adrenal cortex.— In: *Function of adrenal cortex* / Ed. K. W. McKerns. N. Y.: Acad. Press, 1968, p. 479—484.
 396. *Meier A., van Woerkom G., Williamson J.* et al. Rate-limiting fac-

- tors in the oxidation of ethanol by isolated rat liver cells.— *Biochem. J.*, 1975, vol. 150, p. 205—209.
397. *Michelson A. M.* Role biologique du radical anion superoxide et des superoxide-dismutase dans le metabolisme cellulaire.— *C. r. seances Soc. B. (P)*, 1976, vol. 170, p. 1137—1146.
398. *Michelson A. M., Buckingham M. E.* Effect of superoxide radicals on myoblast growth and differentiation.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, vol. 58, p. 1079—1086.
399. *Microsomes and drug oxidations* / Ed. R. W. Estabrook et al. Baltimore: Univ. Park Press, 1973, p. 300.
400. *Microsomes and drug oxidations* / Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 450.
401. *Mills G. C.* Hemoglobin catabolism.— *J. Biol. Chem.*, 1957, vol. 229, p. 189—197.
402. *Mills G. C.* Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1960, vol. 86, p. 1—5.
403. *Mills E., Jöbsis F. F.* Mitochondrial respiratory chain of carotid body and chemoreceptor changes in oxygen tension.— *J. Neurophysiol.*, 1972, vol. 35, p. 405—428.
404. *Minakami S., Kakinuma K., Yoshikawa H.* The control of respiration in brain slices.— *Biochim. et biophys. acta*, 1963, vol. 78, p. 808—811.
405. *Mishin V., Pokrovsky A., Lyakhovich V. V.* Interactions of some acceptors with superoxide anion radicale formed by the NADPH-specific flavoprotein in rat liver microsomal fractions.— *Biochem. J.*, 1976, vol. 154, p. 307—340.
406. *Misra M. P., Fridovich I.* The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones.— *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 247, p. 188—192.
407. *Misra M. P., Fridovich I.* Inhibition of SOD by Azide.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1978, vol. 189, 2, p. 317—322.
408. *Misra P., Lefevre A., Ishii H.* et al. Increase of ethanol meprobamate and pentobarbital metabolism after chronic ethanol administration.— *Amer. J. Med. Sci.*, 1969, vol. 258, p. 35—39.
409. *Mitchell P.* Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Bodmin: Glynn Res., 1966, p. 199.
410. *Mitchell P.* Chemiosmotic coupling in energy transduction.— *J. Bioenerg.*, 1972, vol. 3, p. 5—24.
411. *Mitnick M. H., Jöbsis F. F.* Pyrenbutric acid as an optical oxygen probe in the intact cerebral cortex.— *J. Appl. Physiol.*, 1976, vol. 41, p. 593—596.
- 411a. *Mokhova E. N., Skulachev V. P., Zhigacheva I. V.* Activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, vol. 501, p. 415—425.
412. *Moffet D. F., Jöbsis F. F.* Response to toad brain respiratory chain enzymes to ouabain elevated potassium and electrical stimulus.— *Brain Res.*, 1976, vol. 117, p. 239—255.
413. *Moldeus P., Andersson B., Norling A.* Interaction of ethanol oxidation with glucuronidation in isolated hepatocytes.— *Biochem. Pharm.*, 1978, vol. 28, 22, p. 2583—2588.
414. *Moldeus P., Cha J. N., Cinti D. L.* Hepatic Organelle interaction.— *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, N 24, p. 8574—8584.
415. *Moldeus P., Grundin R., Vadi H.* et al. A study of drug metabolism

- linked to cytochrome P-450 in isolated rat-liver cells.—*Europ. J. Biochem.*, 1974, vol. 46, p. 351—360.
416. *Moldeus P., Grundin R., von Barth C.* Spectral studies on drug cytochrome P-450 interaction in isolated rat-liver cells.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1973, vol. 55, p. 937—945.
417. *Morawetz R., Strong E., Clark D. K. et al.* Effects of ischemia on the oxygen diffusion coefficients in the brain cortex.—*Adv. exp. med. et biol.*, 1978, vol. 94, p. 629—682.
418. *Nathan C. F., Brunkner L. H., Silverstein S. E. et al.* Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes I—II.—*J. Exp. Med.*, 1979, vol. 149, p. 84—113.
419. *Nathan C. F., Root R. K.* Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages.—*J. Exp. Med.*, 1977, vol. 146, N 6, p. 1648—1662.
420. *Nechelets T. F.* The clinical spectrum of glutathione peroxidase deficiency.—In: *Glutathione* / Ed. L. Flohe et al. Stuttgart: Thieme, 1974, p. 173—180.
421. *Netter K. G.* Eine Methode zur direkten messung der O-Demethylierung in Lebermikrosomen und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmenwirkung von SKF 525 A.—*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. und Pharmacol.*, 1960, Bd. 238, N 2, S. 292—300.
422. *Neubert D., Wojtczak A. B., Lehninger A. L.* Purification and enzymatic identity of mitochondrial contraction-factors I—II.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1962, vol. 48, p. 1651—1658.
423. *Nicholls P.* Activity of catalase in the red cell.—*Biochim. et biophys. acta*, 1965, vol. 99, p. 286—297.
424. *Nicholls P.* Contributions of catalase and glutathione peroxidase to red cell peroxide removal.—*Biochim. et biophys. acta*, 1972, vol. 279, p. 306—309.
425. *Nicholls P., Schonbaum G. R.* Catalases.—In: *The Enzymes* / Ed. P. Boyer et al. N. Y.: Acad. Press, 1963, vol. 8, p. 147—225.
426. *Nishiki K., Erecińska M., Wilson D.* Energy relation between cytosolic metabolism and mitochondrial respiration in isolated perfused rat heart under various work loads.—*Amer. J. Physiol.*, 1978, vol. 234, p. C73—C81.
427. *Nishiki K. N., Erecińska M., Wilson D. F.* Effect of amytal on metabolism of perfused rat heart.—*Amer. J. Physiol.*, 1979, vol. 6 (3), p. C221—C230.
428. *Nohl H., Hegner D.* Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? —*Europ. J. Biochem.*, 1978, vol. 82, p. 563—567.
429. *Nohl H., Jordan W.* The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide.—*Europ. J. Biochem.*, 1980, vol. 111, p. 203—210.
430. *Nosworthy J., Karnovsky M. L.* Role of peroxide in the stimulation of the hexose monophosphate shunt phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes.—*Enzyme*, 1972, vol. 13, p. 110—131.
431. *Novikoff P. M., Novikoff A. B.* Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine.—*J. Cell Biol.*, 1972, vol. 53, p. 532—560.
432. *O'Connor M. J.* Origin of the labile NADH tissue fluorescence of intact brain tissue.—In: *Oxygen and physiological function* / Ed. F. F. Jobsis. Dallas (Texas): Profess. Inform. Libr., 1977, p. 90—99.
433. *Olson R. O., Boerth R. C.* Hydrogen peroxide: Beneficial effects in rabbits following acute coronary occlusion.—*Amer. J. Physiol.*, 1978, vol. 234, N 1, p. H28—H34.
434. *Ontko J. A.* Rate control of the citric acid cycle in isolated intact liver cells.—In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. G. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 299—315.
435. *Opitz E., Schneider M.* The oxygen supply of the brain and the mechanism of deficiency effects.—*Ergebn. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharm.*, 1950, Bd. 46, S. 126—160.
436. *Orrenius S.* On the mechanism of drug hydroxylation in rat liver microsomes.—*J. Cell Biol.*, 1965, vol. 26, N 3, p. 713—733.
437. *Orrenius S., Dallner G., Ernster L. et al.* Inhibition of the TPNH—linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1964, vol. 14, N 4, p. 329—334.
438. *Orrenius S., Ernster L.* Phenobarbital—induced Synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver microsomes.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1964, vol. 16, p. 60—64.
439. *Orrenius S., Kupfer D., Ernster L.* Substrate binding to cytochrome P-450 of liver and adrenal microsomes.—*FEBS Lett.*, 1970, vol. 6, p. 249—252.
440. *Orrenius S., Moldeus P., Thor H.* The physiological implications to the cell.—In: *Microsomes and drug oxidations* / Ed. V. Ulrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 292—306.
441. *Orringer E. P., Roer M. E.* An ascorbate-mediated transmembrane-reducing system of the human erythrocyte.—*J. Clin. Invest.*, 1979, vol. 69, N 1, p. 51—58.
442. *Oshino N., Chance B.* Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver and their implications for the physiological function of catalase.—*Biochem. J.*, 1977, vol. 162, p. 509—525.
443. *Oshino N., Chance B., Sies H.* The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors.—*Arch. Biochem. and Biophys.*, 1973, vol. 154, p. 117—131.
444. *Oshino N., Jamieson D., Chance B.* The properties of hydrogen peroxide production under hyperoxic and hypoxic conditions of perfused rat liver.—*Biochem. J.*, 1975, vol. 146, p. 53—65.
445. *Oshino N., Jamieson D., Sugano T. et al.* Optical measurement of the catalase hydrogen peroxide intermediate (compound I) in the liver of anaesthetized rats and its implication to hydrogen peroxide production in situ.—*Biochem. J.*, 1975, vol. 146, p. 67—77.
446. *Owen C. S., Wilson D. F.* Control of respiration by the mitochondrial phosphorylation state.—*Arch. Biochem. and Biophys.*, 1974, vol. 161, p. 581—591.
447. *Oxidases and related redox systems* / Ed. T. E. King et al. Baltimore: Univ. Park Press, 1973, 883 p.
448. *Oxygen transport to tissue-III* / Ed. I. A. Silver. N. Y.: Plenum Press, 1978, 795 p.
449. *Packer L., Gomez-Puy P.* Mitochondria: Bioenergetics, biogenesis and membrane structure / Ed. N. Y.: Acad. Press, 1976, 125 p.
450. *Paine A. J.* Exited states of oxygen in biology.—*Biochem. Pharm.*, 1978, vol. 27, p. 1805—1813.
451. *Panchenko L. F., Brusov O. S., Gerasimov A. M. et al.* Intramitochondrial localization and release of rat liver superoxide dismutase.—*FEBS Lett.*, 1975, vol. 55, p. 84—87.

452. *Papenberg J., Wartburg J. P., Aebi H.* Metabolism of ethanol and fructose in the perfused rat liver.— *Enzyme Biol. Clin.*, 1970, vol. 11, p. 237—250.
453. *Pappius R. M., Elliott K. A. C.* Factors affecting the potassium content of incubated brain slices.— *Canad. J. Biochem.*, 1956, vol. 34, p. 1053—1058.
454. *Parrilla R., Ohkawa K., Lindros K. et al.* Functional compartmentation of acetaldehyde oxidation in rat liver.— *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, N 15, p. 4926—4933.
455. *Pashko L., Longmair I. S.* Changes in cytochrome P-450 levels in response to light and dark in relation to oxygen transport.— *Fed. Proc.*, 1974, vol. 33, p. 389—374.
456. *Paul B. B., Strauss R. R., Jacobs A. A. et al.* Direct involvement of NADPH oxidase with the stimulated respiratory and hexose monophosphate shunt activities in phagocytizing leukocytes.— *Exp. Cell Res.*, 1972, vol. 73, p. 456—462.
457. *Peeters-Joris C., Vandevoorde A. M., Baudhuin P.* Subcellular localization of superoxide dismutase in rat liver.— *Biochem. J.*, 1975, vol. 150, p. 31—39.
458. *Perry S. V.* The control of muscle contraction. Cambridge: Univ. Press, 1973. 273 p.
459. *Petersen C. L., Nicholls P., Degh H.* The effect of energization on the apparent Michaelis-Menten constant for oxygen in mitochondrial respiration.— *Biochem. J.*, 1974, vol. 142, p. 247—252.
460. *Peretsman S. J., Rosenthal M.* Brain cytochrome aas, redox state measured in situ in chronic cat preparations effects of hyperoxia and direct cortical stimulation.— *Brain Res.*, 1977, vol. 128, p. 553—558.
461. *Porter N. A., Funk M. O., Gilmore D. W. et al.* Model studies of prostaglandins: Biosynthesis and pharmacological properties of cyclic peroxides.— In: *Biochemical aspects of prostaglandins and thromboxanes* / Ed. N. Kharasch et al. New-York: Acad Press, 1977, p. 39—53.
462. *Powis G., Grant L.* The effect of inhibitors of alcohol metabolism upon the changes in the hepatic microsomal metabolism of foreign compounds produced by the acute administration of some alcohols to the rat.— *Biochem. Pharm.*, 1976, vol. 25, p. 2197—2201.
463. *Portwich F., Aebi H.* Erfassung der peroxydbildung trierischer gewebe mittels peroxydatischer Umsetzungen.— *Helv. physiol. acta*, 1960, vol. 18, p. 312—327.
464. *Prohaska J. R., Ganther H. E.* Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, vol. 76, p. 437—445.
465. *Prough R. A., Masters B. S.* The mechanism of Cytochrome b₅ Reduction by NADPH-Cytochrome c₅ Reductase.— *Arch. Biochem.*, 1974, vol. 165, p. 263—267.
466. *Quistorff B., Chance B., Hunding A.* An experimental model of the krogg tissue-III / Ed. I. A. Silver. N. Y.: Plenum Press, 1978, p. 127—133.
467. *Racker E.* A new look at mechanisms in bioenergetics. L.: Acad. Press, 1976, p. 250.
468. *Ramirez J.* Oxidation-reduction changes of cytochromes following stimulation of amphibian cardiac muscle.— *J. Physiol.*, 1959, vol. 147, p. 14—19.
469. *Rang H. P., Ritchie J. M.* The dependence on external cations of the oxygen consumption of mammalian non-myelinated fibres at rest and during activity.— *J. Physiol.*, 1968, vol. 196, p. 163—185.
470. *Rasmussen U. F.* The oxidation of added NADH by intact heart mitochondria.— *FEBS Lett.*, 1969, vol. 2, p. 157—162.
471. *Reed P. W.* Glutathione and the hexose monophosphate shunt in phagocytizing and hydrogen peroxide treated rat leucocytes.— *J. Biol. Chem.*, 1969, vol. 244, p. 2459—2464.
472. *Reid W. D., Glick J. M., Krishne G.* Metabolism of foreign compounds by alveolar macrophages of rabbits.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, vol. 49, N 3, p. 626—631.
473. *Reif A. E., Potter V. R.* Oxidative pathways insensitive to antimycin A.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1976, vol. 48, p. 1—6.
474. *Reinke L. A., Kauffman F. S., Belinsky S. A. et al.* Interaction between ethanol metabolism and mixed-function oxidation in perfused rat liver.— *J. Pharm. and Exp. Ther.*, 1980, vol. 213, p. 70—78.
475. *Remmer H.* Induction of drug metabolizing enzyme system in the liver.— *Europ. J. Clin. Pharm.*, 1972, vol. 5, p. 116—136.
476. *Remmer H., Merker H. J.* Effect of drug on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug metabolism enzymes.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965, vol. 123, p. 79—91.
477. *Roach M. K., Reese W. N., Creaven P. J.* Ethanol oxidation in the microsomal fraction of rat liver.— *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, 1969, vol. 36, N 4, p. 569—602.
478. *Root R. K., Metcalf J., Oshino N. et al.* H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis.— *J. Clin. Invest.*, 1975, vol. 55, p. 945—955.
479. *Rossi F., Romeo D., Patriarca P.* Mechanism of phagocytosis — associated oxidative metabolism in polymorphonuclear leucocytes and macrophages.— *Reticuloendothel. Soc. J.*, 1972, vol. 12, p. 127—149.
480. *Rossi F., Zatti M.* Changes in the metabolic patterns of polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis.— *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1964, vol. 45, p. 548—558.
481. *Rosenthal M., Jobsis F. F.* Intracellular redox changes in the functioning cerebral cortex.— *J. Neurophysiol.*, 1971, vol. 34, p. 750—762.
482. *Rosenthal M., La Manna J. C.* Effect of ouabain and phenobarbital on kinetics of cortical metabolic transient associated with evoked potentials.— *J. Neurochem.*, 1975, vol. 24, p. 111—116.
483. *Rubin E., Cederbaum A. I.* Effects of chronic ethanol feeding and acetaldehyde on mitochondrial functions and the transfer reducing equivalents.— In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. G. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 435—455.
484. *Saks V. A., Kupriyanov V. V., Elizarova G. V.* Studies of energy transport in heart cells.— *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, p. 755—763.
485. *Salin M. L., McCord J. M.* Superoxide dismutases in polymorphonuclear leucocytes.— *J. Clin. Invest.*, 1974, vol. 54, p. 1005—1009.
486. *Sasame H. A., Ames M. M., Nelson S. D.* Cytochrome P-450 and NADPH cytochrome c-reductase in rat brain.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, vol. 78, p. 3—8.
487. *Sauer L. A.* Steroid hydroxylation in rat adrenal mitochondria. III. The ATP-steroid-oxygen stoichiometry of ATP-dependent ste-

- roid hydroxylation.—*Biochim. et biophys. acta*, 1971, vol. 234, p. 287—292.
488. *Saunders B. C., Holmes-Siedle A. G., Stark B. P.* Peroxidase. Wash.: D. C. Batterworths, 1964. 361 p.
 489. *Savolainen H.* Superoxide dismutase and glutathione in rat brain.—*Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm.*, 1978, vol. 1, p. 173—176.
 490. *Sbarra A. J., Karnovsky M. L.* The metabolic basis of phagocytosis.—*J. Biol. Chem.*, 1959, vol. 234, p. 1355—1362.
 491. *Schindler F. J.* *Инт.* no [459].
 492. *Scholz R.* Mechanism of the Fructose effect on Ethanol oxidation.—In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1978, vol. 3, p. 305—312.
 493. *Scholz R., Bucher Th.* Hemoglobin-free perfusion of rat liver.—In: *Control of energy metabolism* / Ed. B. Chance. N. Y.; L.: Acad. Press, 1965, p. 393—414.
 494. *Scholz R., Hansen W., Thurman R. G.* Interaction of mixed-function oxidation with biosynthetic processes. I. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver.—*Europ. J. Biochem.*, 1973, vol. 38, p. 64—72.
 495. *Scholz R., Koltstein A., Schwabe U.* et al. Inhibition of fatty acid synthesis from carbohydrates in perfused rat liver by ethanol.—In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. G. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 315—328.
 496. *Scholz R., Nohl H.* Mechanism of the stimulatory effect of fructose on ethanol oxidation in perfused rat liver.—*Europ. J. Biochem.*, 1976, vol. 60, p. 449—458.
 497. *Scholz R., Schwarz F., Bucher T.* Barbiturate und energieliefernder stoffwechsel in der hamoglobinfrei durchstromten leber der ratte.—*Ztschr. Klin. Chem.*, 1966, bd. 4, s. 179—184.
 498. *Scholz R., Thurman R. G., Williamson R. J.* et al. Flavin and pyridine nucleotide oxidation-reduction changes in perfused rat liver.—*J. Biol. Chem.*, 1969, vol. 244, p. 2317—2324.
 499. *Schonlich J.* The induction of chromosomal aberrations by hydrogen peroxide in strains of ascites tumors in mice.—*Mut. Res.*, 1967, vol. 4, p. 385—388.
 500. *Schwarzmann V., Grunewald W. A.* Myoglobin O₂-saturation profiles in muscle sections of chicken gizzard and the facilitated O₂-transport by myoglobin.—*Adv. exp. med. et biol.*, 1978, vol. 94, p. 301—310.
 501. *Shan M. N., Clarecy B., Iber F. L.* Comparison of blood clearance of ethanol and tolbutamide and the activity of hepatic ethanol-oxidizing and drug-metabolising enzymes in chronic alcoholic subjects.—*Amer. J. Clin. Nutr.*, 1972, vol. 25, p. 135—139.
 502. *Sharma V., Banekjee S.* Effect of chronic ethanol treatment on specific (³H) ouabain binding to (Na⁺+K⁺) —ATP-ase in different areas of cat brain. *Europ. J. Pharm.*, 1979, vol. 58, p. 297—304.
 503. *Short C. R., Kinden D. A., Stith R.* Fetal and Neonatal Development of the Microsomal Monooxygenase System.—*Drug Metabol. Rev.*, 1976, vol. 5, N 1, p. 1—42.
 504. *Sies H.* Biochemistry of the peroxisomes in the liver cell.—*Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.*, 1974, vol. 13, p. 706—718.
 505. *Sies H.* Nicotinamide nucleotide systems and drug oxidation in the liver cells.—*Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem.*, 1976, Bd. 357, N 8, S. 1055—1059.
 506. *Sies H.* Peroxisomal enzymes and metabolism in liver.—In: *Tissue hypoxia and ischemia* / Ed. M. Reivich. et al. N. Y.: L.: Plenum Press, 1977, p. 19—35.
 507. *Sies H.* Cytochrome oxidase and urate oxidase as intracellular O₂ indicators.—In: *Oxygen transport to tissue. III* / Ed. J. A. Silver. N. Y.: Plenum Press, 1978, p. 561—566.
 508. *Sies H., Bartoli O. M., Burk R. F.* et al. Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment during drug oxidations and in selenium deficiency.—*Europ. J. Biochem.*, 1978, vol. 89, p. 113—118.
 509. *Sies H., Brauser B.* Interaction of mixed function oxidase with its substrates and associated redox transitions of cytochrome P-450 and pyridine nucleotides in perfused rat liver.—*Europ. J. Biochem.*, 1970, vol. 15, p. 531—540.
 510. *Sies H., Kandel M.* Positive increase of redox potential of the extramitochondrial NADP(H) system by mixed function oxidations in hemoglobin-free perfused rat liver.—*FEBS Lett.*, 1970, vol. 9, p. 205—208.
 511. *Sies H., Summer K. H.* Hydroperoxide metabolizing systems in rat liver.—*Europ. J. Biochem.*, 1975, vol. 57, p. 503—512.
 512. *Siesjo B., Nordstrom C.-H., Rehnstrom S.* Metabolic aspects of cerebral hypoxia-ischemia.—In: *Tissue hypoxia and ischemia* / Ed. M. Reivich. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977, p. 261—269.
 513. *Silver J. A.* Cellular microenvironment in relation to local blood flow.—In: *Ciba Foundation Symp. 56.* North-Holland Amsterdam: Elsevier — Excerpta med., 1978, p. 49—67.
 514. *Sjoblom J., Morland J.* Metabolism of ethanol and acetaldehyde in parenchymal and non-parenchymal rat liver cells.—*Biochem. Pharmacol.*, 1979, vol. 28, p. 3417—3423.
 515. *Slater E. C., Rosing J., Mol A.* The phosphorylation potential generated by respiring mitochondria.—*Biochim. et biophys. acta*, 1973, vol. 292, p. 534—553.
 516. *Snow T. R., Wechsler A. S., Jobsis F. F.* et al. Response of cytochrome a — a₃ in the in situ canine heart.—*Fed. Proc.* 1977, vol. 36, p. 518.
 517. *Srivastava S. K., Awassthi Y. C., Bentler E.* Organic hydroperoxides.—*Biochem. J.*, 1974, vol. 139, p. 289—295.
 518. *Stadinger H., Zubrzycki Z.* Zur Kinetik der microsomalen NADN-oxidation bei verschiedenen Sauer-Stoffdrucken.—*Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, 1965, Bd. 340, S. 491—498.
 519. *Starlinger H., Lübberts D. W.* Polarographic measurement of the oxygen pressure performed simultaneously with optical measurements of the redox state of the respiratory chain in suspensions of mitochondria under steady state conditions at low oxygen tensions.—*Pflügers Arch. Europ. J. Physiol.*, 1973, Bd. 341, S. 15—22.
 520. *Stier A., Kuhnle W., Rosen R.* Lipid structure of liver microsomal membranes limitations of a model.—In: *Microsomes and drug oxidations* / Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 1—8.
 521. *Stokes A. N.* Rapid oxygen entry into unperfused tissue slices.—*J. Theor. Biol.*, 1976, vol. 60, p. 473—475.
 522. *Strickland E. H., Ziegler F. D., Anthony A.* Oxygen electrode for measurement of tissue slice respiration.—*Nature*, 1961, vol. 191, p. 969—971.

523. Strittmatter P., Spatz L., Corcoran D. et al. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl Coenzyme A desaturase.—*Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 1974, vol. 71, p. 4565—4569.
524. Stubbs M., Veech R. L., Krebs H. A. Control of the redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotide couple in rat liver cytoplasm.—*Biochem. J.*, 1972, vol. 126, p. 59—65.
525. Sugano T., Oshino W., Chance B. Mitochondrial functions under hypoxic conditions.—*Biochim. et biophys. acta*, 1974, vol. 347, p. 340—358.
- 525a. Svingen B. A., Buege J. A., O'Neal F. et al. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation.—*J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, p. 5892—5899.
526. Swanson P. D. The effects of oxygen deprivation on electrically stimulated cerebral cortex slices.—*J. Neurochem.* 1969, vol. 16, p. 35—45.
527. Sylvia A. L., La Manna J. C., Rosenthal M. et al. Metabolite studies of methamphetamine effects based upon mitochondrial respiratory state in rat brain.—*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1977, vol. 201, p. 117—125.
528. Sylvia A. L., Rosenthal M. Age-dependent differences in cytochrome a₃ redox activities associated with evoked potential and spreading cortical depression.—*Physiologist*, 1978, vol. 20, p. 93—97.
529. Szekely M., Manyai S., Straub F. H. Über den Mechanismus der Osmotischen Hemolyse.—*Acta physiol. Acad. sci. Hung.*, 1952, vol. 3, p. 571—583.
530. Takahara S. Catalasemia in Japan.—In: *Hereditary disorders of erythrocyte metabolism*/Ed. E. Beutler. N. Y.: Grune and Stratton, 1968, p. 21—40.
531. Takahashi G. H., Fatt I. The diffusion of oxygen in the cornea.—*Exp. Eye Res.*, 1965, vol. 4, p. 4—12.
532. Takanaka K., O'Brien P. J. Mechanisms of H₂O₂ formation by leukocytes.—*Arch. Biochem. and Biophys.*, 1975, vol. 169, N 2, p. 428—435.
533. Tang P. S. Илт. no [459].
534. Taylor D. Influence of oxygen tension on respiration fermentation and growth in wheat and rice.—*Amer. J. Bot.*, 1942, vol. 29, p. 721—737.
535. Taylor W. M., Halperin M. Stimulation of glucose transport in rat adipocytes by insulin adenosine, nicotinic acid and hydrogen peroxide.—*Biochem. J.*, 1979, vol. 178, p. 381—389.
536. Terzuolo C. A., Chance B., Handelman E. et al. Measurements of reduced pyridine nucleotides in a single neuron.—*Biochim. et biophys. acta*, 1966, vol. 126, p. 361—369.
537. Teschke R., Nasumura Y., Lieber C. Hepatic microsomal alcohol oxidizing system.—*J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, p. 7397—7404.
538. Teschke R., Nasumura Y., Lieber C. S. Hepatic ethanol metabolism.—*Arch. Biochem.*, 1976, vol. 175, p. 635—643.
539. Thayer W. S. Adriamycin-stimulated superoxide formation in sub-mitochondrial particles.—*Chem. Biol. Interact.*, 1977, vol. 19, p. 265—278.
540. Theorell H. The iron-containing enzymes B catalases and peroxidases hydroperoxidases.—In: *The enzymes*/Ed. J. B. Sumner et al. N. Y.: Acad. Press, 1951, vol. 2, p. 397—427.
541. Theorell H., Chance B., Jonetani T. et al. The combustion of alcohol and its inhibition by 4-methyl-pyrazole in perfused rat livers.—*Arch. Biochem. and Biophys.*, 1972, vol. 151, p. 434—444.
542. Thews G. Oxygen diffusion in the brain.—*Pflüg. Arch.*, 1960, Bd. 271, S. 197—226.
543. Thurman R. G., Ley H. G., Scholz R. Hepatic microsomal ethanol oxidation, hydrogen peroxide formation and the role of catalase.—*Europ. J. Biochem.*, 1972, vol. 25, p. 420—430.
544. Thurman R. G., Lurquin M., Evans R. et al. The Role of reducing equivalents generated in mitochondria in hepatic mixed — function oxidation.—In: *Microsomes and drug oxidation*/Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 486—492.
545. Thurman R. G., McKenna W. R. Pathways of ethanol metabolism in perfused rat liver.—In: *Biochemical pharmacology of ethanol*/Ed. E. Majchrowicz. N. Y.: Plenum Press, 1975, vol. 56, p. 57—76.
546. Thurman R. G., Scholz R. Mixed Function oxidation in perfused rat liver: The effect of amidopyrine on oxygen uptake.—*Europ. J. Biochem.*, 1969, vol. 10, p. 459—467.
547. Thurman R. G., Scholz R. Interaction of mixed-function oxidation with biosynthetic processes.—*Europ. J. Biochem.*, 1973, vol. 38, p. 73—85.
548. Thurman R. G., Scholz R. Interaction of glycolysis and respiration in perfused rat liver.—*Europ. J. Biochem.*, 1977, vol. 75, p. 13—21.
549. Thurman R., Scholz R. Mechanism of increased hepatic oxygen uptake due to ethanol.—In: *Alcohol and aldehyde metabolizing Systems*/Ed. R. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1978, vol. 3, p. 99—108.
550. Tischler M. E., Coli D. F., Williamson J. R. Pyridine nucleotide distribution and enzyme mass action ratios in hepatocytes from fed and starved rats.—*Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, vol. 184, p. 222—236.
551. Tomoda A., Sugimoto R., Suhara M. et al. Haemichrome formation from haemoglobin subunits by hydrogen peroxide.—*Biochem. J.*, 1978, vol. 171, p. 329—335.
552. Tottmar S. O. C., Pettersson H., Kiessling K.-H. The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver.—*Biochem. J.*, 1973, vol. 135, p. 577—586.
553. Tottmar S. O. C., Pettersson H., Kiessling K.-H. Aldehyde dehydrogenases in rat liver.—In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems*/Ed. R. G. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 147—160.
554. Tsyrllov J., Gromova O. A., Lyachovich V. Mechanism of inhibition by carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone and sodium deoxycholate of cytochrome P-450-catalyzed hepatic microsomal drug metabolism.—*Biochem. J.*, 1976, vol. 160, p. 75—83.
555. Tsyrllov J., Polyakova N. E., Gromova O. A. et al. Cholestasias as an in vivo model for analysis of the induction of liver microsomal monooxygenases by sodium phenobarbital and 3-methylcholanthrene.—*Biochem. Pharm.*, 1979, vol. 28, p. 1473—1478.
556. Turrens J. F., Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.—*Biochem. J.*, 1980, vol. 191, p. 421—427.

557. Tyler D. D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver.— *Biochem. J.*, 1975, vol. 147, p. 493—504.
558. Urarte G., Iturriaga H. Metabolic pathways of alcohol in the liver.— In: *Fronties of gastrointestinal research* / Ed. L. van der Reis. Basel: Karger, 1976, vol. 2, p. 150—193.
559. Ullrich V. Enzymic hydroxylations with molecular oxygen.— *Angew. Chem.*, 1972, Bd. 11, S. 702—715.
560. Ulrich V. The mechanism of cytochrome P-450 action.— In: *Microsomes and drug oxidations* / Ed. V. Ulrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 192—201.
561. Vadi H., Moldeus P., Capdevila G. The metabolism of benzo-(a)-pyrene in isolated rat liver cells.— *Cancer Res.*, 1975, vol. 35, p. 2083—2091.
562. Van Berkel T. J., Kruijt J. K. Different types of mitochondria in parenchymal and non-parenchymal rat liver cells.— *Europ. J. Biochem.*, 1977, vol. 73, p. 223—229.
563. Van der Meer R., Akerboom P. M., Groen A. K. et al. Relationship between oxygen uptake of perfused rat liver cells and cytosolic phosphorylation state.— *Europ. J. Biochem.*, 1978, vol. 84, p. 421—428.
564. Van Liew H. D., Chen P. Y. Interaction of O₂ diffusion and O₂ metabolism in cat urinary bladder tissue.— *Amer. J. Physiol.*, 1975, vol. 229, N 2, p. 444—448.
565. Van Rossum G. Observation on respiratory pigments in slices of avian salt gland.— *Biochim. et biophys. acta*, 1965, vol. 110, p. 221—236.
566. Van Rossum G. Observation on respiratory pigments in slices of avian salt gland and rat livers. II. Evidence for reverse of electron transfer.— *Biochim. et biophys. acta*, 1965, vol. 110, p. 237—248.
567. Vaughan W. M., Weber G. Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water: A dynamic probe of the microenvironment.— *Biochemistry*, 1970, vol. 9, N 3, p. 464—473.
568. Vargaftig B. B., Tranter J., Chignard M. Blockage by metal complexing agents and by catalase of the effects of arachidonic acid on platelets: Relevance to the study on anti-inflammatory mechanism.— *Europ. J. Pharmacol.*, 1975, vol. 33, p. 19—29.
569. Veech R. L. The effects of ethanol on the free nucleotide systems and related metabolites in liver and brain.— In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems* / Ed. R. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 383—394.
570. Veech R. L., Gwynn R. W. The control of hepatic fatty acid synthesis in vivo.— In: *Regulation of hepatic metabolism* / Ed. F. Lundquist et al. Copenhagen, 1974, p. 337—348.
571. Vlanus J., Davis A. Germination, growth, respiration rate of rice at low oxygen pressure.— *Plant Physiol.*, 1943, vol. 18, p. 685—692.
572. Von Bahr C., Vadi H., Grundin R. et al. Spectral studies on the rapid uptake and subsequent binding of drugs to cytochrome P-450 in isolated rat liver cells.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, vol. 59, p. 334—339.
573. Wagner M., Erecińska M. Experimental and theoretical studies of the electron transport chain.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1971, vol. 147, p. 666—674.
574. Warburg O. Versuche on überlebendem Carcinomgewebe (Methoden).— *Biochem. Ztschr.*, 1923, Bd. 142, S. 317—333.
575. Warburg O. Über Eisen den sauerstoffübertragenden Bestandteil des Atmungsferments.— *Bioch. Ztschr.*, 1924, Bd. 152, S. 479—494.
576. Warburg O. Über die Grundlagen der wielandschen Atmungstheorie.— *Biochem. Ztschr.*, 1923, Bd. 142, S. 518—523.
577. Warburg O., Negelein E. Über das Absorptionsspektrum des Atmungsferments.— *Biochem. Ztschr.*, 1929, Bd. 214, S. 64—100.
578. Weigl K., Sies H. Drug oxidations dependent on cytochrome P-450 in isolated hepatocytes.— *Europ. J. Biochem.*, 1977, vol. 77, p. 401—406.
579. Weisiger R. A., Fridovich I. Superoxide dismutase.— *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, p. 3582—3592.
580. Weisiger R. A., Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and intramitochondrial localization.— *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, p. 4793—4796.
581. Weiss Ch. Critical oxygen tension and rate of respiration of isolated kidney cells.— In: *Oxygen transport to blood and tissue* / Ed. G. T. Verlah. Stuttgart: Thieme, 1968, p. 227—237.
582. Welton A. F., O'Neal F. O., Chaney L. C. et al. Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes.— *J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, p. 5631—5636.
583. Wendell G. D. Effect of Ethanol concentration on rates of ethanol elimination in normal and alcohol-treated rats in vivo.— *Biochem. Pharmacol.*, 1979, vol. 28, N 2, p. 273—279.
584. Wendt J. R., Chapman J. B. Fluorometric studies of recovery metabolism of rat fast and slow-twitch muscles.— *Amer. J. Physiol.*, 1976, vol. 230, p. 1644—1649.
585. Werrigloer J. The formation of hydrogen peroxide during hepatic microsomal electron transport reaction.— In: *Microsomes and drug oxidations* / Ed. V. Ullrich et al. Oxford: Pergamon Press, 1977, p. 261—268.
586. Whitmer J. T., Idell-Wenger J. A., Rovetto M. J. et al. Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts.— *J. Biol. Chem.*, 1978, vol. 253, p. 4305—4309.
587. Wiebkin P., Fry J. R., Jones C. A. et al. The metabolism of biphenyl by isolated viable rat hepatocytes.— *Xenobiotica*, 1976, vol. 6, N 12, p. 725—743.
588. Wieland H. Über den Mechanismus der Oxidationsvorgänge.— *Liebig's Ann.*, 1925, Bd. 445, S. 181—201.
589. Wieland H., Mitchell W. Über den Mechanismus der Oxidationsvorgänge.— *Liebig's Ann.*, 1932, Bd. 492, S. 156—182.
590. Wikstrom M., Krab K. Proton-pumping cytochrome c oxidase.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, vol. 549, p. 177—222.
591. Williams R. T. Detoxication mechanisms / Ed. A. Chapman et al. L.: J. Wiley and Sons, 1959. 423 p.
592. Williamson J. R., Ohkawa K., Meijer A. J. Regulation of ethanol oxidation in isolated rat liver cells.— In: *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems* / Ed. R. G. Thurman et al. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 365—382.
593. Wilson D. F., Erecińska M. Thermodynamic relationships between the phosphate potential and oxidation-reduction potentials in the respiratory chain.— In: *Mitochondria / Biomembranes* / Ed. S. G. van der Bergh et al. Amsterdam: North-Holland, 1972, vol. 28, p. 119—132.

594. *Wilson D., Erecińska M.* Control of energy flux in biological systems.—Hoppe-Seyler's Ztschr. phys. Chem., 1978, Bd. 359, N 4, S. 456—463.
595. *Wilson D. F., Erecińska M., Drown C.* et al. Effect of oxygen tension on cellular energetics.—Amer. J. Physiol., 1977, vol. 233, N 5, p. 135—140.
596. *Wilson D. F., Erecińska M., Drown C.* The oxygen dependence of cellular energy metabolism.—Arch. Biochem. and Biophys., 1979, vol. 195, p. 484—493.
597. *Wilson D. F., Erecińska M., Dutton P.* Thermodynamic relationship to mitochondrial oxidative phosphorylation.—Annu. Rev. Biophys. and Bioenerg., 1974, vol. 3, p. 203—230.
598. *Wilson D. F., Erecińska M., Owen C.* Some properties of the redox components of cytochrome c oxidase and their interactions.—Arch. Biochem. and Biophys., 1976, vol. 175, p. 160—172.
599. *Wilson D. F., Leigh J. S., Lindsay J. G.* et al. Some thermodynamic properties and interaction of the hemes and copper of native cytochrome oxidase.—In: Oxidases and related redox systems / Ed. T. E. King et al. Baltimore: Univ. Park Press, 1972, vol. 2, p. 715—736.
600. *Wilson D. F., Miyata Y., Erecińska M.* An aryl suitable for photo-affinity labelling of amine groups in proteins.—Arch. Biochem. and Biophys., 1975, vol. 174, p. 104—107.
601. *Wilson D. F., Owen C., Erecińska M.* Quantitative dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation on oxygen concentration.—Arch. Biochem. and Biophys., 1979, vol. 195, N 2, p. 494—534.
602. *Wilson D. F., Owen C., Holian A.* Control of mitochondrial respiration.—Arch. Biochem. and Biophys., 1977, vol. 182, p. 749—762.
603. *Wilson D. F., Owen C., Mela L.* Control of mitochondrial respiration by the phosphate potential.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, vol. 53, p. 326—333.
604. *Wilson D. F., Stubbs P., Noech R.* et al. Equilibrium relations between the oxidation reduction reactions and the adenosine triphosphate synthesis in suspensions of isolated liver cells.—Biochem. J., 1974, vol. 140, p. 57—64.
605. *Wilson D. F., Stubbs M., Oshino N.* et al. Thermodynamic relationship between the mitochondrial oxidation—reduction reactions and cellular ATP levels in ascites tumor cell and perfused rat liver.—Biochemistry, 1974, vol. 13, p. 5305—5311.
606. *Wince K. T.* Stimulation adenylate cyclase from isolated hepatocytes and Kupffer cells.—J. Biol. Chem., 1975, vol. 250, p. 8863—8873.
607. *Wittam R., Blond D. M.* Respiratory control by an adenosine triphosphatase level in active transport in brain cortex.—Biochem. J., 1964, vol. 92, p. 147—160.
608. *Wladaver P., Kindahl H., Hamberg M.* Biosynthesis of prostaglandin F_2 from arachidonic acid and prostaglandin endoperoxide in the uterus.—Biochim. et biophys. acta, 1976, vol. 43, p. 603—614.
609. *Wyman J.* Facilitated diffusion and the possible role of myoglobin as a transport mechanisms.—J. Biol. Chem., 1966, vol. 241, p. 115—121.
610. *Yamaga S., La Manna J. C., Younts W. B.* et al. Responses of oxidative metabolism and extracellular potassium to afferent stimulation of the cat spinal cord.—Fed. Proc., 1977, vol. 36, p. 516.

611. *Yost F., Fridovich I.* Superoxide radicals and phagocytosis.—Arch. Biochem. and Biophys., 1974, vol. 161, p. 395—401.
612. *Yuki T., Thurman R. G.* The swift increase in alcohol metabolism.—Biochem. J., 1980, vol. 186, N 1, p. 119—126.
613. *Yuki T., Thurman R. G., Schwabe U.* et al. Metabolic changes after prior treatment with ethanol evidence against an involvement of the Na^+ , K^+ activated ATP-ase in the increase in ethanol metabolism.—Biochem. J., 1980, vol. 186, p. 997—1000.
614. *Zabucchi G., Maszi T., Rossi F.* Kinetic and enzymatic features of metabolic stimulation of alveolar and peritoneal macrophages challenged with bacteria.—Exp. Cell Res., 1973, vol. 78, p. 423—432.
615. *Zeigler F. D., Strickland E. M., Anthony A.* Polarographic Studies of energy metabolism rat liver homogenates.—Amer. J. Physiol., 1963, vol. 205, p. 241—248.
616. *Zimmerman R., Flohe L., Weser U.* et al. Inhibition of lipid peroxidation in isolated membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase.—FEBS Lett., 1973, vol. 29, p. 117—120.
617. *Zuurendonk P. F., Tager J. M.* Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolated rat liver cells.—Biochim. et biophys. acta, 1974, vol. 333, p. 393—399.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА ЗА 1981 Г.

- Асланиди К. Б., Чубаков А. Р.* О некоторых механизмах регуляции мембранного потенциала клеток нейроглии в культуре ткани. Путино: Научный центр биологических исследований АН СССР, 1981. Препринт. 11 с.
- Бонензак Р., Кюстер У., Легко Г.* Стадии, регулирующие скорость окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крысы.—В кн.: Регуляция процессов обмена веществ и энергии. М.: Наука, 1981, с. 11—12.
- Витецкий В. М., Атауллатанов Ф. И., Жаботинский А. М.* и др.—Там же, с. 18—19.
- Каган В. Е.* Механизмы структурно-функциональной модификации биомембран при перекисном окислении липидов: Автореф. дис. докт. биол. наук. М., 1981. 47 с.
- Горкин В. З.* Аминоксидазы и их значение в медицине. М.: Медицина, 1981. 332 с.
- Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Попова О. А.* и др. Регуляция и взаимодействие митохондриального и немитохондриального окисления в интактных клетках.—В кн.: Реакции живых систем и состояние энергетического обмена. Путино, 1981, с. 27—50.
- Меерсон Ф. З., Голубева Л. Ю., Каган В. Е. и др.* Активация перекисного окисления липидов как решающее звено в патогенезе стрессорных повреждений сердца и предупреждение стрессорных и гипоксических повреждений антиоксидантом ионолом.—В кн.: Метаболизм миокарда. М.: Медицина, 1981, с. 237—250.
- Панченко Л. Ф., Герасимов А. М., Антоненков В. Д.* Роль перокси-сом в патологии клетки. М.: Медицина, 1981. 207 с.

- Розенштраух Л. В., Сакс А. В., Шаров В. М. и др. — В кн.: Метаболизм миокарда. М.: Медицина, 1981, с. 88–106.
- Сакс В. А., Куприянов В. В., Елизарова Г. В. и др. Механизмы регуляции синтеза креатинфосфата в клетках миокарда: сопряжение с реакциями гликолиза и митохондриальным окислительным фосфорилированием, значение компартментализации креатинкиназы. — В кн.: Метаболизм миокарда. М.: Медицина, 1981, с. 67–87.
- Хватова Е. М., Семенова Т. С., Гарсия А. Взаимодействие гликолитических в окислительных реакций при избытке восстановительных эквивалентов в нервной ткани. — В кн.: Регуляция процессов обмена веществ. Таллин, 1981, с. 101.
- Чистяков В. В., Поспелова Л. Н. Восстановление микросомального цитохрома Р-450 дыхательной цепью митохондрий печени. — Там же, с. 105–106.
- Шаов М. Т. Динамика напряжения кислорода и электрической активности клеток мозга в норме и при гипоксии. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1981, № 4, с. 22–26.
- Bernofsky C., Gallagher W. J. Nonenzymic hydrogen transfer between reduced and oxidized pyridine nucleotides. — Bioch. et Biophys. Acta, 1981, Bd. 569, blz. 1–6.
- Bigley R., Riddle M., Layman D. et al. Human cell dehydroascorbate reductase kinetic and functional properties. — Bioch. et biophys. Acta, 1981, Bd. 659, blz. 15–22.
- Cadenas E., Varsavsky A., Voeris A. et al. Oxygen-organic hydroperoxide induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. — Biochem. J., 1981, vol. 198, p. 645–654.
- Cederbaum A. I., Quereshi A., Messenger P. Oxidation of isopropanol by rat liver microsomes. — Biochem. Pharmacol., 1981, vol. 30, p. 825–831.
- Cohen H. J., Newburger P. E., Chovanec M. E. NAD(P)H-dependent superoxide production by phagocytic vesicles from guinea pig and human granulocytes. — J. Biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 6584–6588.
- Dudchenko A., Popova O., Lukjanova L. The role of adenine nucleotides and redox-states of liver cells under the conditions of mixed function oxidation reactions activation. — In: 9th Colloq. on bioenerg., mitochondria. Vernigerode, 1981, S. 4–26.
- Holian A., Wilson D. F. Relationship of transmembrane pH and electrical gradients with respiration and adenosine 5'-triphosphate synthesis in mitochondria. — Biochemistry, 1980, vol. 19, p. 4213–4221.
- Holland M. K., Storey B. T. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. — Biochem. J., 1981, vol. 198, p. 273–280.
- Jones D., Eklöv R., Thor H. et al. Metabolism of H₂O₂ in isolated hepatocytes. — Arch. Biochem. and Biophys., 1981, vol. 210, p. 505–516.
- Jones D. P. Hypoxia and drug metabolism. — Biochem. Pharmacol., 1981, vol. 30, p. 1019–1023.
- Kunz W., Bohnensack R., Böhme G. et al. Relations between extramitochondrial and intramitochondrial adenine nucleotide systems. — Arch. Biochem. and Biophys., 1981, vol. 209, p. 219–229.
- Letko G., Küster U., Bohnensack R. et al. Interrelationship between oxidative energy transformation and energy consumption on mitochondrial and cellular levels. — In: 9th Colloq. on bioenerget., mitochondria. Vernigerode, S. 42.

- Lukjanova L., Romanova V., Popova O. et al. The role of some citric acid cycle substrates in maintaining the activity of mixed-function oxidation reactions. — Ibid., S. 4–27.
- Miles Ph., Wright J., Bowman L. et al. Inhibition of hepatic microsomal lipid peroxidation by drug substrates without drug metabolism. — Biochem. and Pharmacol., 1980, vol. 29, p. 565–570.
- Noshiro M., Ullrich V., Omura I. Cytochrome b₅ as electron donor for oxy-cytochrome P-450. — Eur. J. Biochem., 1981, Bd. 118, S. 521–526.
- Sacs V., Kuprianov V., Elisarova G. Studies of energy transport in heart cells. — J. Biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 755–763.
- Schellenberger W., Eschrich K., Hofmann E. Self-stabilisation of the energy charge in a reconstituted enzyme system containing phosphofructokinase. — Eur. J. Biochem., 1981, Bd. 118, S. 309–314.
- Soboll S., Akertboom Th., Schwenke W. et al. Mitochondrial and cytosolic ATP/ADP ratios in isolated hepatocytes. — Biochem. J., 1980, vol. 192, p. 951–954.
- Teshke R., Moreno F., Petrides A. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS). — Biochem. and Pharmacol., 1981, vol. 30, p. 1745–1751.
- Thurman R. G., Reinke L. A., Belinsky S. et al. Co-regulation of the mixed-function oxidation of p-nitroanisole and glucoronidation of p-nitrophenol in the perfused rat liver by carbohydrate reserves. — Arch. Biochem. and Biophys., 1981, vol. 209, p. 137–142.
- Ugolev A., Romanova V., Dudchenko A. et al. Regulation of the hepatocytes respiratory chain activity at low pO₂. — In: 9th Colloq. on bioenerg., mitochondria. Vernigerode, 1981, p. 4–27.
- Wu T.-F., Davis E. Regulation of glycolytic flux in an energetically controlled cell-free system. — Arch. Biochem. and Biophys., 1981, vol. 209, p. 85–99.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. КИСЛОРОД И КЛЕТКА	10
Транспорт кислорода к тканям и его регуляция	10
Напряжение кислорода в клетках и тканях и его регуляция	18
Основные закономерности зависимости скорости дыхания от pO_2	28
Зависимость скорости дыхания от pO_2 в срезах тканей	35
Влияние альтернативных кислородзависимых путей окисления в клетке на формирование зависимости скорости дыхания от pO_2	42
2. РЕГУЛЯЦИЯ ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ	51
Общие принципы образования энергии в клетке	51
✓ Факторы регуляции дыхания в изолированных митохондриях	55
Состояние дыхательной цепи в клетках	65
✓ Факторы регуляции дыхания в клетке	75
Механизмы регуляции клеточного дыхания при низких pO_2	86
✓ Оценка состояния различных участков дыхательной цепи в интактных клетках и тканях	92
Исследование состояния различных участков дыхательной цепи в тканевых препаратах при изменении функционального состояния	105
3. КИСЛОРОДЗАВИСИМАЯ СИСТЕМА МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КЛЕТКЕ	117
Микросомальный электронтранспортный комплекс	118
Взаимодействие электронтранспортных цепей эндоплазматического ретикулума	124
Процессы метаболизирования ксенобиотиков в интактной клетке	127
Соотношение митохондриальных и немитохондриальных кислородзависимых путей в клетке	131
Роль кислорода и НАДФН в микросомальных и митохондриальных процессах	138
Микросомально-митохондриальные взаимодействия при активации монооксигеназных реакций	143
Немитохондриальные кислородзависимые процессы в различных тканях	151

Роль микросомального окисления в физиологических процессах клетки	153
Взаимодействие митохондриальных и цитоплазматических редокс-цепей при окислении этанола	157
4. ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ИХ РОЛЬ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ	170
Образование H_2O_2 в клетке	171
Источники возбужденных состояний кислорода в клетке	176
Внутриклеточная регуляция промежуточных продуктов восстановления кислорода	179
Регуляция редокс-состояния клетки при метаболизме гидроперекисей	185
Физиологическая роль промежуточных продуктов восстановления кислорода в жизнедеятельности клетки	187
5. ОБМЕН ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМИ ЭКВИВАЛЕНТАМИ МЕЖДУ КЛЕТКОЙ И СРЕДОЙ	195
Перенос восстановительных эквивалентов через мембрану эритроцитов	198
Восстановление феррицианида калия в суспензии клеток дрожжей	204
Восстановление феррицианида калия в суспензии клеток асцитной карциномы Эрлиха	209
Восстановительная активность срезов печени по отношению к феррицианиду калия	215
ПРИЛОЖЕНИЕ	221
Методы прижизненной регистрации окислительно-восстановительных превращений в кислородзависимых реакциях	221
Методические замечания к использованию клеточно-тканевых препаратов	236
Клеточно-тканевые модели в качестве биологической тест-системы при поиске биологически активных соединений в условиях скрининга	242
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	257
ЛИТЕРАТУРА	262